



TITLE:

生体触媒を用いた不斉合成反応の 立体選択性の制御(Dissertation_全 文)

AUTHOR(S):

河合, 靖

CITATION:

河合, 靖. 生体触媒を用いた不斉合成反応の立体選択性の制御. 京都大学
, 1992, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1992-05-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3089063>

RIGHT:

②

生体触媒を用いた不斉合成反応の
立体選択性の制御

1991

京都大学
化学研究所

河合 靖

目 次

第1章 不斉合成	1
1.1 序論	1
1.2 化学的不斉合成	3
1.3 生体触媒を用いた不斉合成	9
1.3.1 生体触媒による変換反応	9
1.3.2 微生物による不斉還元	10
1.3.2.1 ケト酸誘導体の還元	10
1.3.2.2 芳香族ケトンの還元	29
1.3.2.3 脂肪族ケトンの還元	29
1.3.2.4 ジケトンの還元	32
1.3.2.5 炭素-炭素二重結合の還元	44
1.3.2.6 アシロイン縮合	49
1.3.3 還元反応における立体選択性の制御	49
1.3.3.1 微生物のスクリーニングによる方法	50
1.3.3.2 基質の修飾による方法	54
1.3.3.3 反応条件の検討による方法	59
1.3.4 その他の生体触媒による反応	62
1.3.4.1 酵素による還元	62
1.3.4.2 酸化反応	63
1.3.4.3 光学分割	64
第2章 パン酵母による不斉還元の立体選択性に及ぼす添加剤の効果	66
2.1 序論	66
2.2 本論	67
2.2.1 α, β -不飽和ケトンの添加	67
2.2.2 ハロエステルの添加	74
2.2.3 塩類の添加	76
2.3 実験の部	86

第3章	パン酵母による不斉還元の立体選択性に及ぼす添加剤および熱処理の効果	98
3.1	序論	98
3.2	本論	100
3.2.1	添加剤の効果	100
3.2.2	熱処理の効果	101
3.2.3	添加剤存在下における熱処理パン酵母による還元	106
3.3	実験の部	109
第4章	パン酵母による不斉還元における立体制御の機構	113
4.1	序論	113
4.2	本論	114
4.2.1	酸化還元酵素の単離	114
4.2.2	不飽和ケトンを添加した際の反応機構	121
4.2.3	ハロエステルを添加した際の反応機構	126
4.2.4	塩類を添加した際の反応機構	129
4.2.5	熱処理を行った際の反応機構	129
4.3	実験の部	134
謝 辞		148
発表論文のリスト		149
参考文献		151

第1章 不斉合成

1.1 序論

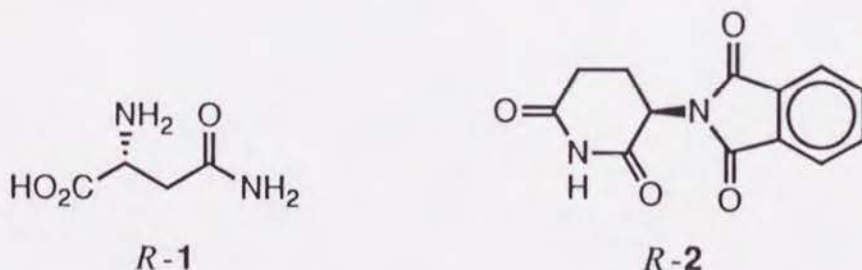
生命体の構成要素である炭水化物、脂質、タンパク質、及び核酸にはほとんど例外無く不斉炭素が含まれている。それ故に、これらの不斉分子によって成り立っている生命体は、非常に高度な不斉の世界となっている。したがって自然界は不斉が完全に識別されている世界なのである。この生命体の中であって、あらゆる化学変化を触媒しているのが酵素である。酵素は全ての化学反応を常温、常圧、中性条件下でしか行えないという厳しい制約があるにも関わらず、実に巧みに反応を制御し迅速に反応を行っている。その上なお高度な立体特異性、位置特異性、および基質特異性を実現している。これは例えば、アセトアルデヒドを還元してエタノールを合成するという簡単な反応においても厳格に行われている。つまり、酵素はアセトアルデヒドのカルボニル基の表裏を識別し、一方向からしか水素移動を起こさないのである。実際、同位体で標識したアセトアルデヒドを用いれば、光学活性なエタノールを合成する事ができる。このように酵素反応は、アキラルな分子からアキラルな分子を合成するという簡単な反応においてさえ、立体特異的に進行しているのである。

一方、実験室のフラスコの中ではどうだろう、ここには全く不斉な場は存在していない。ここでは、合成化学者は意図的に不斉な反応場を構築しない限り、ラセミ体しか合成する事ができない。しかし、有機合成化学は生体機能の解明や有用物質の生産という使命から、光学的に純粋な化合物の合成を余儀なくされている。有機化学者は、酵素が持っている特異性の高い反応を目指しそれを模倣する事によって、またそれとは違った立場から、純粋に化学的に分子設計や反応場の設計をすることによって、フラスコの中での高い不斉誘起を実現可能なものとしてきた。

有用物質の生産を目的とした不斉合成にはもう一つの方法がある。生体触媒を利用した有機合成である。これは酵素あるいは微生物を単なる触媒としてとらえ、酵素が持っている不斉な反応場を借りて有機合成に役立てようというものである。もし酵素が持っている立体特異性と位置特異性だけを利用して有機合成に応用出来るとしたら、これは有効な不斉合成法と成り得る。

しかし酵素にはもう一つの特異性である基質特異性がある。酵素は生体基質の反応を触媒するために進化して来たものであり、少しでも基質の構造が変わってしまうとその反応性や特異性は極端に低下してしまう。一般性に欠けるのである。有機合成における触媒として考えた場合には、類似した化合物の全てに適用できる様な汎用性が望まれる。この有機合成試薬としての酵素の欠点を克服し、本来持っている立体特異性と位置特異性を有効に利用するために、幅広い研究が行われている。

完全に不斉を認識している生命体に、人間が合成したラセミ体の化合物を作用させると、しばしば不都合な、あるいは悲劇的な事が起こる。その典型的な例としてよく引用されるのが、アスパラギン **1** とサリドマイド **2** の例である。*R*体のアスパラギンは甘いが*S*体のアスパラギンは苦い。また*R*体のサリドマイドは催眠作用だけを持っているが*S*体のサリドマイドは非常に強い催奇性がある。そしてこのサリドマイド禍は合成化学者に対して、立体選択的な合成反応の開発の必要性を強く示唆している。同じ過ちを二度と繰り返してはいけないのである。

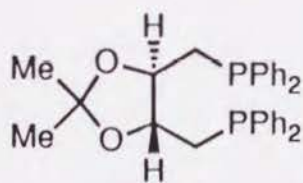


今日までに不斉合成は、有機化学の中で最も重要な分野の一つとして、多くの研究者による活発な研究がなされ、急速に発展してきた。合成化学者達は生体内での反応のような、温和な条件下での位置特異的、立体特異的、かつ迅速で副反応の起きない反応が、有機合成反応としてフラスコの中で再現できる日を夢見て研究に邁進してきた。その結果、特にここ20年間の発展はめざましく、不斉収率が90%を超えるような新しい実用的な不斉合成法が次々に確立されている。その結果として不斉合成は、化学、生化学はもちろん医薬品、農薬、食品そして最近では液晶材料の分野にまで幅広く貢献している。

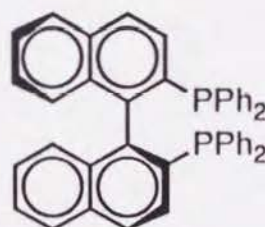
1.2 化学的不斉合成

有機化学における不斉合成は、1890年のFischer¹によるL-alabinoseのシアノヒドリン反応によるL-mannonitrileの合成に始まる。その後、1950年代のCram²やPrelog³らの先駆的な研究によって、不斉誘起に関する系統的な研究が始まり、不斉合成はその後の有機化学の重要な一分野として発展してきた。当時の成果については1971年のMorrisonとMosherの著書⁴にまとめられているが、そこには不斉収率が90%を越えるような実用的な不斉合成法はほんの数例しか報告されていなかった。しかし、その後の20年間のこの分野の進歩は目ざましく、次々と高選択的な不斉合成反応が開発されている。^{5,6}

例えば還元反応では、Kaganら^{7,8}のキラルなジホスフィン(DIOP, **3**)を配位子とするロジウム錯体を用いた触媒的不斉還元が最初の高選択的な例である。この反応は均一系である事と触媒的に進行する事から不斉還元法としては有効である。また、野依ら^{9,10}のBINAP **4**を配位子とするRh錯体やRu錯体を初めとする、キラルなジホスフィンを配位子とした有機金属錯体^{5,6,11}が高選択的な不斉還元触媒として多数報告されている(図1-1)。



(R,R)-**3**



(S)-**4**

また化学量論的不斉還元では、大野ら^{12,13}のNAD(P)Hモデル化合物であるMe₂PNPH **5**によるケトンの還元が始まるジヒドロニコチンアミドを用いた不斉還元¹⁴や、Midlandら^{15,16}のAlpine-Borane **6**によるケトンの不斉還元、野依ら¹⁷のBINAL-II **7**によるケトンの還元が始まるキラルなリチウムアルミニウムヒドリドを用いた不斉還元^{5,6,11}が高選択的な還元反応として報告されている(図1-1)。しかしこれらの反応は不斉源を化学量論的に用いなくてはならないので、今後触媒的な反応の開発が望まれる。

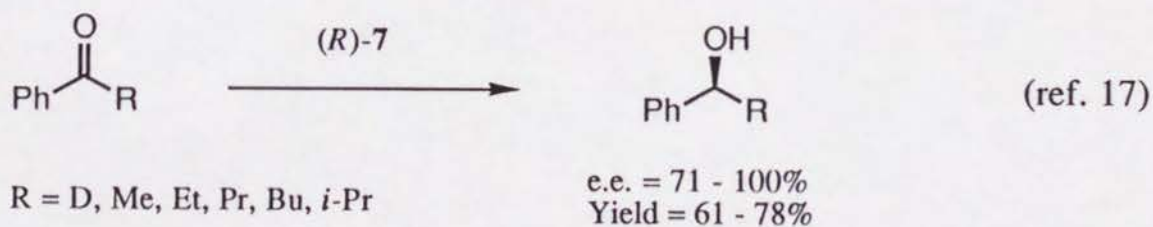
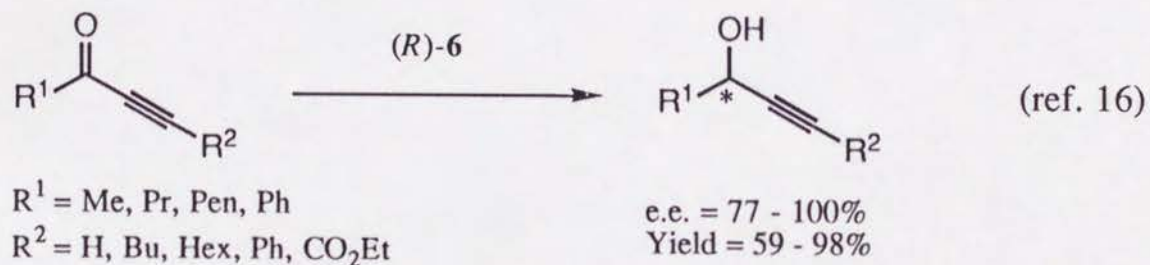
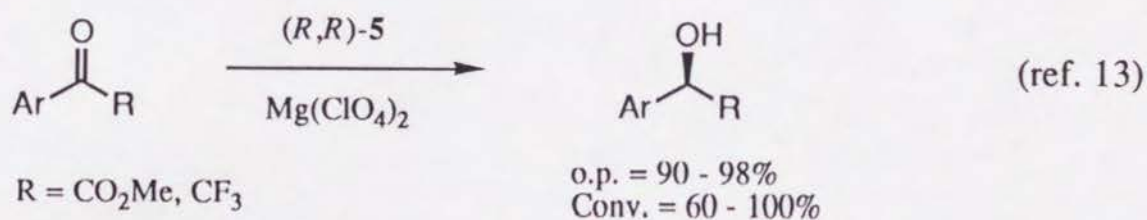
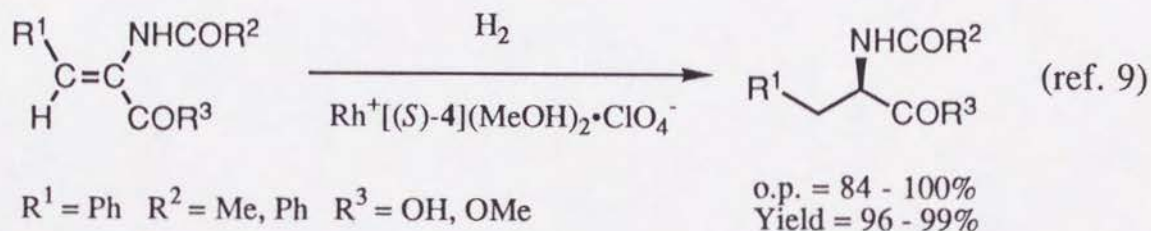
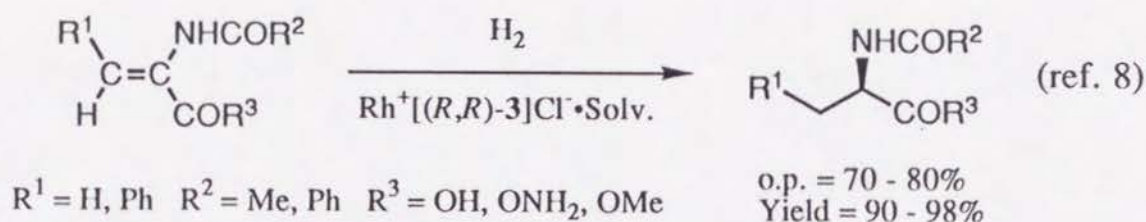
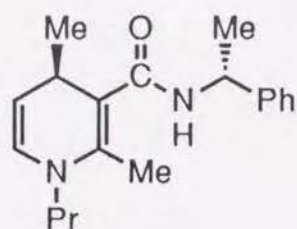
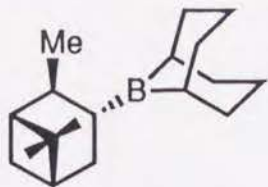


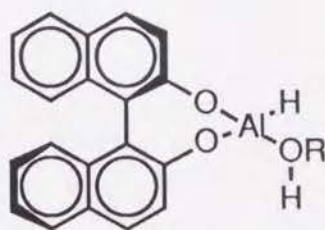
图1-1 化学的不斉還元



(R,R)-5

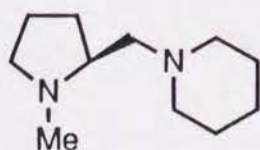


(R)-6

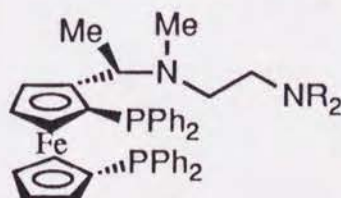


(R)-7

炭素-炭素結合生成反応では、カルボニル基へのジアステレオ選択的な求核付加反応に関する研究がCram²やPrelog³らによって始められ、以後膨大な数の報告^{4,5,11}がなされているが、エナンチオ選択的な反応に関しては満足のいく結果が得られていない。それに対して不斉アルドール反応では、多くの高選択的な反応が報告されている（図1-2）。例えば、Heathcockら^{18,19}はキラルなアルデヒドとアキラルなエノラートとの反応で、かさ高いエノラート（*t*-ブチルエステルの*t*-ブチルジメチルシリルエノラート）を用いルイス酸を添加する事によって高い選択性を得ている。Evansら^{20,21}はキラルなオキサゾリドン環を有するホウ素エノラートとアキラルなアルデヒドとの反応で、非常に高いジアステレオ選択性とエナンチオ選択性でエリトロ体のヒドロキシエステルが得られる事を報告している。正宗ら^{22,23}もキラルなホウ素エノラートとアキラルなアルデヒドとの反応で、エリトロ体のヒドロキシ酸を選択的に合成している。また、向山ら²⁴はキラルなジアミン **8** のスズ錯体をプロモーターとするアルドール反応で、アキラルなエノラートとアキラルなアルデヒドから光学活性なカルボン酸誘導体が選択的に得られる事を報告している。これらの先駆的な研究をはじめとして、不斉アルドール反応に関しては多数の報告がある^{4,5,10}が、それらは全て不斉源を化学量論的に用いなくてはならない。しかし、最近では伊藤ら²⁵によってキラルなフェロセニルホスフィン **9** を配位子とする金錯体を用いた触媒的な不斉アルドール反応も報告されている。



8



9

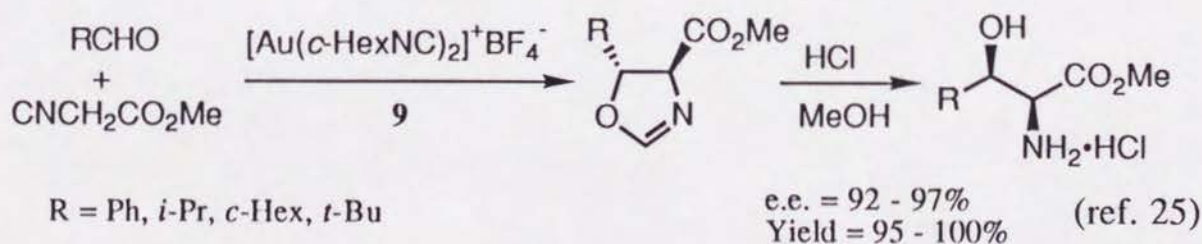
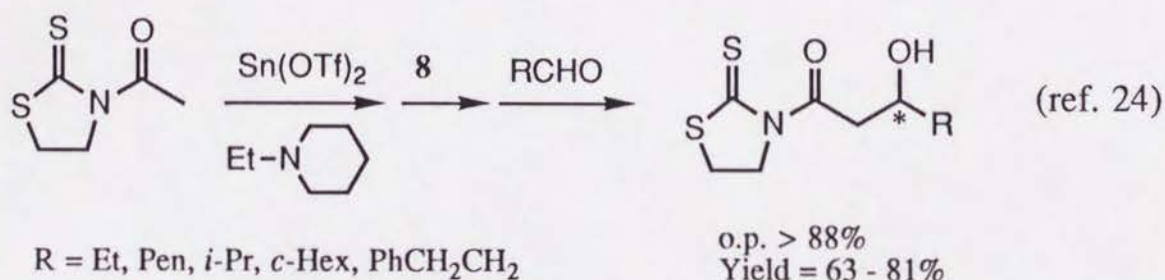
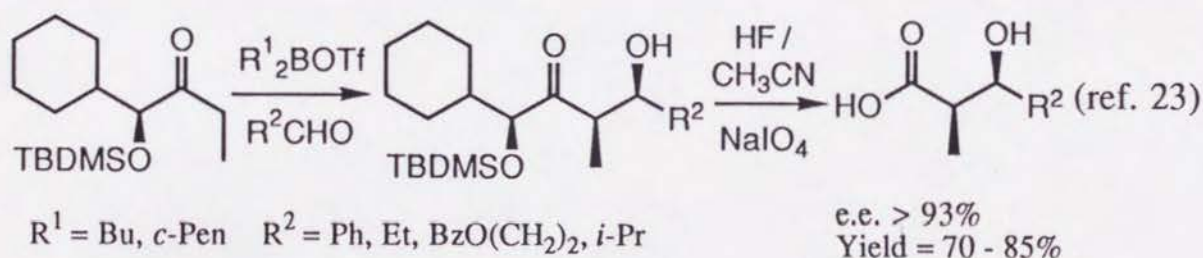
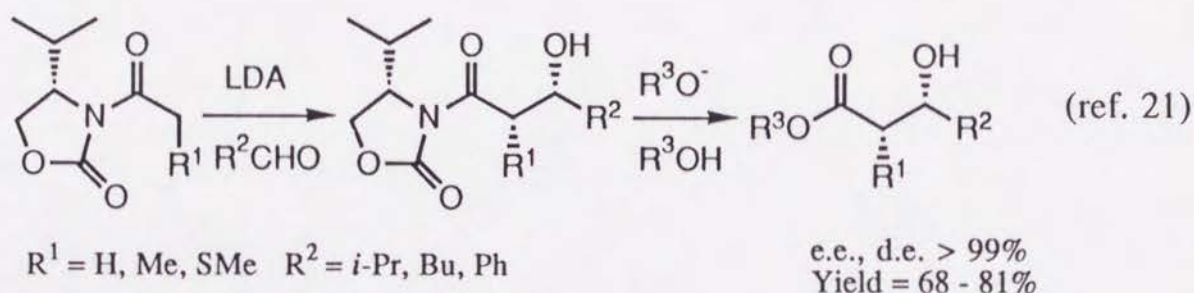
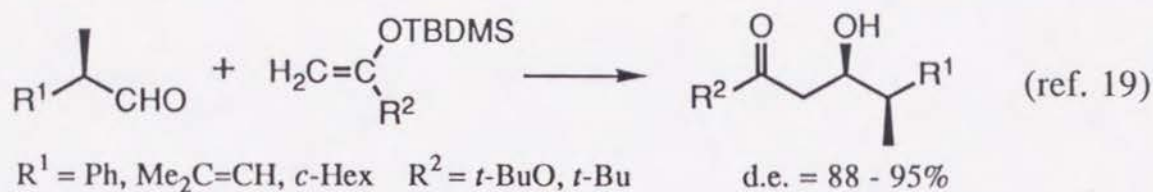
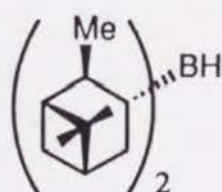


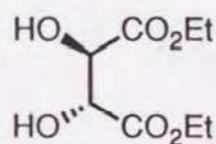
図1-2 化学的不斉アルドール反応

環状付加反応で不斉誘起を行う事ができれば、一度に多くの不斉点が導入できる事から、不斉合成として有効であると考えられる。この分野ではDiels-Alder反応に関する研究例が最も多い(図1-3)。例えば、Trostら²⁶はジエン部に不斉源として*O*-メチルマンデル酸を導入し、 π - π 相互作用を利用した不斉誘起に成功している。また、Oppolzerら²⁷も同様に π - π 相互作用を利用して、アクリル酸の(-)-8-フェニルメンチルエステルとシクロペンタジエンの誘導体との反応で、付加体を高い不斉収率で得ている。また、不斉収率は低い但不斉源を触媒量用いたDiels-Alder反応の報告²⁸もある。

酸化反応では、Brownら^{29,30}の(IPC)₂BH **10**に始まる不斉ヒドロボレーション-酸化反応が最初の高選択的な例である。また、香月、Sharpless³¹によるアリルアルコールの不斉エポキシ化反応も高選択的な酸化反応を実現している。この反応はキラルな配位子である酒石酸ジエチル **11**が触媒量でよく、尚かつ安価に入手できるという利点があるので実用的な合成法であると言える(図1-4)。



10



(*R,R*)-**11**

以上述べてきたように、化学的不斉合成はこの20年間に大きな進歩を見せた。しかし触媒量の不斉源で高い選択性を達成している実用的な不斉合成法は、ロジウム-ホスフィン錯体による不斉還元と香月-Sharplessの不斉エポキシ化反応ぐらいであろう。特に、炭素-炭素結合生成反応における触媒的不斉合成法は今だ実用的な段階には至っていない。今後さらに有効な反応場の設計による高選択的な不斉合成法の開発に期待したい。

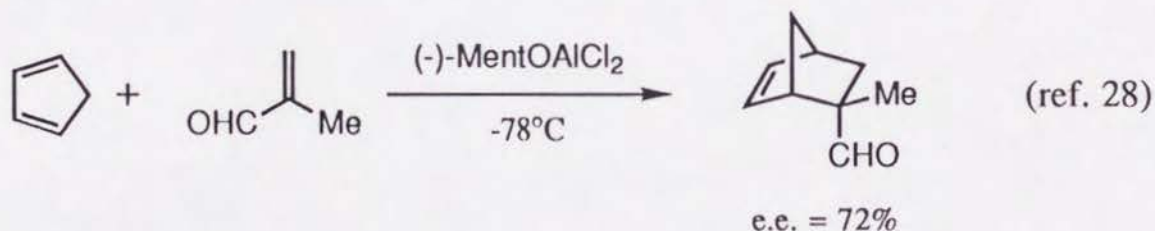
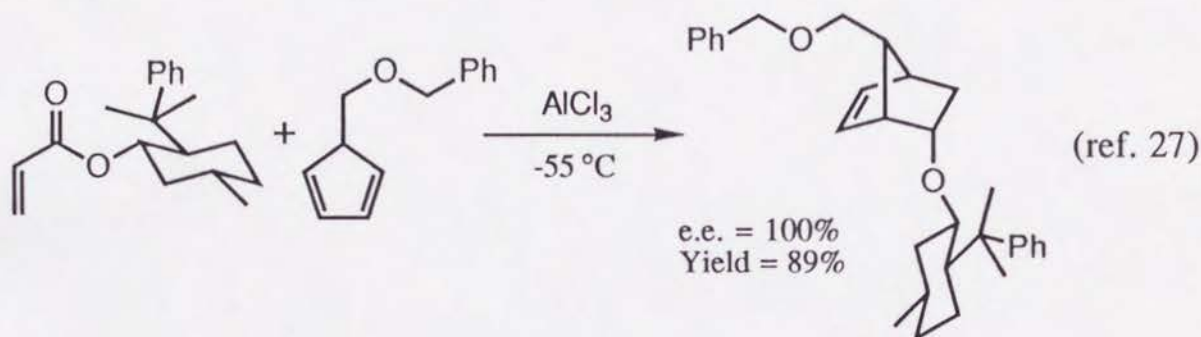
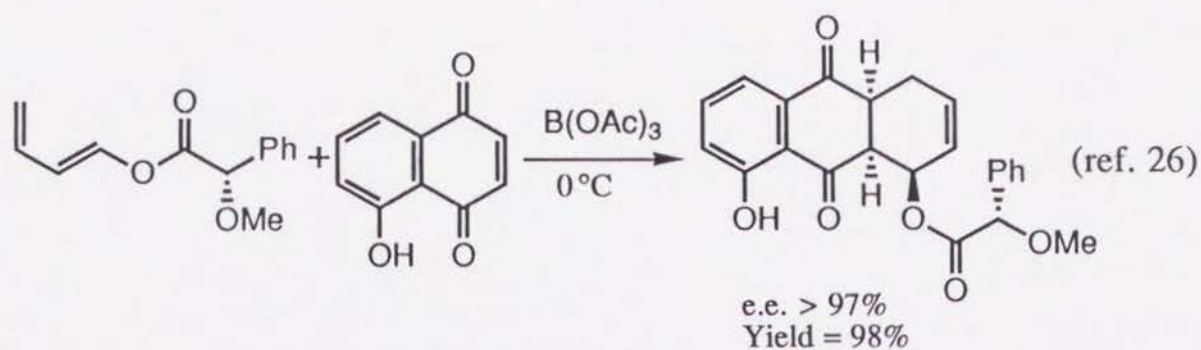


图1-3 化学的不齐 Diels-Alder 反应

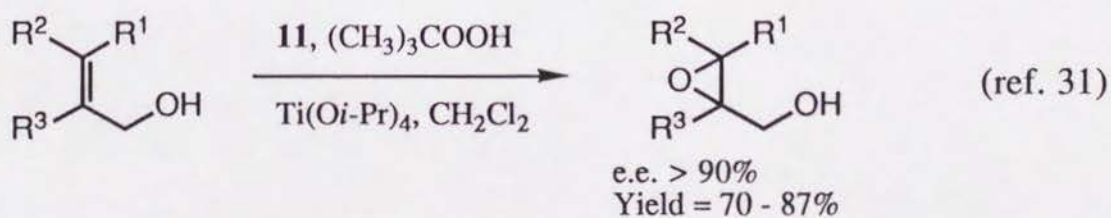
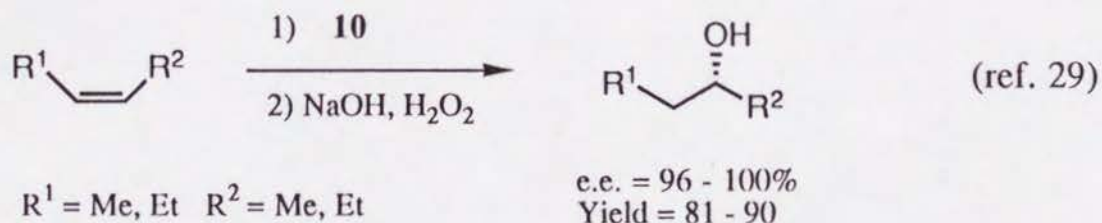


图1-4 化学的不齐酸化

1.3 生体触媒を用いた不斉合成

1.3.1 生体触媒による変換反応

微生物と人間との関わりは主に発酵という形で始まり、酢や酒の醸造やパンの発酵等に古くから利用されてきた。この微生物を単なる酵素の袋 (Bag of Enzymes) とみなし、酵素の持つ触媒作用だけを積極的に利用しようという研究が始められたのは今世紀に入ってからのことである。1910年代にNeubergらはアルデヒドの還元³²、 α -ジケトン³³の還元、ニトロベンゼンの還元³⁴、ケトグルタル酸の脱炭酸³⁵、ジエステルの加水分解³⁶などが微生物を用いて行える事を示している。その後1952年にPetersonら³⁷は*Rhizopus arrhizus*を用いて、ステロイドであるプロゲステロンの11 α 位に選択的水酸化ができることを示した。この報告以来1970年頃にかけて、多くの研究者によって微生物を用いたステロイドの選択的な変換反応に関する研究が盛んに行われ^{38,39}、医薬用ステロイド製剤の製造に大きく寄与した。また千畑ら⁴⁰は固定化酵素を用いてアミノ酸の光学分割を行い、光学活性アミノ酸の工業的な製造法を確立した。当時、微生物や酵素のような生体触媒は、酵素の生体基質に近い構造を持ち化学的に変換が困難な化合物や、ステロイドのように複雑な化合物の変換に有効であると考えられていた。しかし、1970年代に入り不斉合成の重要性が認識され始めると、生体触媒を単に不斉触媒としてとらえ、種々の非天然型の合成基質の変換反応に応用するようになり、これを利用する反応は化学的不斉合成と並んで重要な不斉合成法として認識され、現在に至っている。

不斉合成の触媒として生体触媒（特に微生物）を用いる場合の利点として、一般的に次のような点が挙げられている。1. 反応が室温で起こるので、加熱や冷却を必要としない。2. 有害な金属や強酸・強塩基を必要としないので後処理が容易である。3. 触媒は高分子物質なので生成物との分離が容易である。4. 触媒が光学活性なアミノ酸からできているので、光学活性な生成物が得られる。5. 微生物には多くの酵素が含まれているので、一種類の触媒で数多くの反応が可能である。また同時に、次のような欠点も指摘されている。1. 有機化学の研究室での微生物の培養は難しい。2. 基質濃度を高くできない。3. 微生物には多くの酵素が含まれているので、副反応が起こりうる。4. 酵素には基質特異性があるので、生体基質とかけ離れた構造を持つ合成基

質を作用させた場合に、酵素反応の特異性や反応性が極端に低下してしまう場合が多い。5. 不斉収率は必ずしも高くなく、しかも通常は片方の鏡像体しか得られない。

しかしこの様な問題に対しても、反応に用いる微生物や酵素をスクリーニングしたり、微生物を固定化したり、基質の構造を酵素に合わせて変換するなどして、高い立体選択性を実現している例が数多く報告されるようになってきた。以下、著者が行った還元反応を中心に生体触媒による不斉合成反応について詳しく述べる。

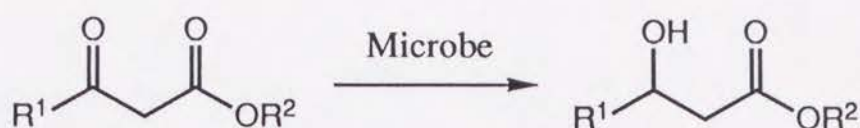
1.3.2 微生物による不斉還元

微生物が種々の不飽和結合を還元する能力を有する事は古くから知られていたが、立体選択性についての研究⁴¹はあまりなされていなかった。1960年代に入りPrelog⁴²やMosher⁴³らによって、微生物による還元反応の立体選択性に関する研究が進み、この分野での基礎が築かれた。それ以来数多くの立体選択的な還元反応が報告されている。生体触媒の中で最も多く用いられているのはパン酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)である。これは安価で入手が容易である事や、他の微生物のように培養操作を必要としないため普通の試薬と同じように取り扱える事、有機金属触媒の様な無水条件での反応を必要としない事などの利点があるためと考えられる。パン酵母は通常の還元剤よりもむしろ扱い易い試薬である。また、還元する基質としてはケト酸の誘導体に関する研究が最も多く、中でもケトエステルはその大部分を占めている。その他には芳香族ケトンや脂肪族ケトン、ジケトン、炭素-炭素二重結合の還元等が報告されている。

1.3.2.1 ケト酸誘導体の還元

1976年にRidleyら⁴⁴が β -ケトエステル**12**のパン酵母による還元で(S)-ヒドロキシエステルが選択的に得られる事を報告して以来、 β -ケトエステルの不斉還元が盛んに研究されるようになった(表1-1)。中でも、アセト酢酸エチルの還元⁴⁴⁻⁵⁵は多くの研究者によって検討され、85%~99%の不斉収率で(S)-3-ヒドロキシブタン酸エチルが得られている。また、Wipfら⁴⁹は同じ基質を*Geotrichum candidum*で還元すると、逆の立体配置を有する(R)-3-ヒドロキ

表1-1 β -ケト酸誘導体の還元



Substrate		Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
R ¹	R ²					
Me	Et	Bakers' Yeast	80	S(L)	92	44
			64	S(L)	>97	45
			67	S(L)	87	46
			54	S(L)	92	47
			56	S(L)	89	48
			57	S(L)	95-97	49
			36	R(D)	90	49
		<i>Geotrichum candidum</i>	96 ^a	S(L)	86	112
			95 ^a	R(D)	46	112
		<i>Aspergillus niger</i>	98 ^a	R(D)	50	112
		<i>Halobacterium halobium</i>	10-20	S(L)	40-76	113
		Bakers' Yeast ^b	5-75	S(L)	95-99	50
		Bakers' Yeast ^c	42-56	S(L)	95-97	51
		Bakers' Yeast ^c	2-53	S(L)	95-97	52
		Bakers' Yeast ^d	75	S(L)	>95	53
Pr	Et	Bakers' Yeast ^d	95	R(D)	>95	53
Me	Et	Bakers' Yeast	62	S(L)	97	114
Et	Et	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	40	S(L)	93	114
Me	Et	Bakers' Yeast ^e	68	S(L)	40	54
Et	Me	Bakers' Yeast ^e	56	R(D)	96	54
ClCH ₂	Et	Bakers' Yeast ^e	42	S(D)	85	54
Me	Et	Bakers' Yeast	60-80	S(L)	>98	55
		Bakers' Yeast ^f	60-80	S(L)	60	55
Et	Me	Bakers' Yeast	60-80	R(D)	5	55
		Bakers' Yeast ^f	60-80	R(D)	86	55
ClCH ₂	Me	Bakers' Yeast	60-80	R(L)	31	55
		Bakers' Yeast ^f	60-80	S(D)	90	55
ClCH ₂	Et	Bakers' Yeast	60-80	R(L)	42	55

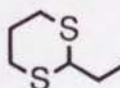
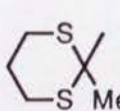
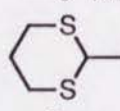
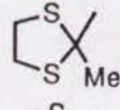
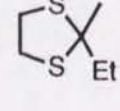
(表1-1 の続き)

		Bakers' Yeast ^f	60-80	S(D)	82	55
Me	Me	<i>Kroekera sp.</i>	47	S(L)	69	115
		<i>Hansenula polymorpha</i>	35	S(L)	44	115
Et	Me	<i>Kroekera sp.</i>	70	R(D)	93	115
		<i>Hansenula polymorpha</i>	65	R(D)	99	115
ClCH ₂	Me	<i>Kroekera sp.</i>	20	S(D)	68	115
		<i>Hansenula polymorpha</i>	5	S(D)	90	115
Et	Et	Bakers' Yeast	67	R(D)	40	66
Et	Oct	Bakers' Yeast	75	S(L)	>95	67
Pr	Et	Bakers' Yeast	50	R(D)	90	68
(S)-s-Bu	K	Bakers' Yeast	16	S(D)	98	69
	Me	Bakers' Yeast	27	S(D)	96	69
	Et	Bakers' Yeast	22	S(D)	89	69
Pen	Et	Bakers' Yeast	32	R(D)	>99	70
Allyl	Me	Bakers' Yeast	65-70	R(D)	78	71
	Et	Bakers' Yeast	65-70	R(D)	43	71
Ph	Et	Bakers' Yeast	60	R(D)	85-90	72
ClCH ₂	Et	Bakers' Yeast	—	S(D)	55	73
	Oct	Bakers' Yeast	70	R(L)	97	73
CCl ₃	Et	Bakers' Yeast	70	S(D)	85	74
CF ₃	Et	Bakers' Yeast	75	R(L)	45	74
CF ₃	Et	Bakers' Yeast	92	R(L)	96	75
C ₇ F ₁₅	Et	Bakers' Yeast	87	(+)	93	75
Cl(CH ₂) ₃	Et	Bakers' Yeast	49	R(D)	30	76
	Bu	Bakers' Yeast	45	S(L)	33	76
	<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	29	S(L)	25	76
	Oct	Bakers' Yeast	62	S(L)	90	76
	Decyl	Bakers' Yeast	14	S(L)	94	76
BrCH ₂	Et	Bakers' Yeast ^g	40-50	S(D)	100	77
N ₃ CH ₂	Et	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	80	77
	CH ₂ Ph	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	95	77
	(CH ₂) ₂ Ph	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	95	77
	Hep	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	100	77
	Oct	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	100	77

(表1-1 の続き)

Me	SEt ^h	Bakers' Yeast	69	S(L)	>96	90
Me	SSMe ⁱ	Bakers' Yeast	50	S(L)	>96	90
Me	SSEt ⁱ	Bakers' Yeast	30	S(L)	>96	90
Me	NHEt ^j	Bakers' Yeast ^b	9	S(L)	90-95	89
Me	NHPh ^j	Bakers' Yeast ^b	36	S(L)	>95	89
Me	CH ₂ SiMe ₃	<i>Kloeckera corticis</i>	90	S(L)	80	116
Me	CH ₂ CMe ₃	<i>Kloeckera corticis</i>	90	S(L)	80	116
Me	(CH ₂) ₂ SiMe ₃	<i>Kloeckera corticis</i>	90	S(L)	80	116
Me	(CH ₂) ₂ CMe ₃	<i>Kloeckera corticis</i>	91	S(L)	65	116
N ₃ CH ₂	NHCH ₂ CO ₂ Et ^j	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	100	78
ClCH ₂	NHCH ₂ CO ₂ Et ^j	Bakers' Yeast	70-80	R(L)	90	78
CH ₃ CONH	Et	Bakers' Yeast	20	R(L)	8	78
CH ₃ CONHCH ₂	Et	Bakers' Yeast	60-80	S(D)	90-95	78
CF ₃ CONHCH ₂	Et	Bakers' Yeast	60-80	S(D)	90-95	78
<i>t</i> -BuOCH ₂	Me	Bakers' Yeast	70	R(L)	82	79
	Et	Bakers' Yeast	72	R(L)	97	79
PhCH ₂ OCH ₂	Et	Bakers' Yeast	58	R(L)	56	79
		Bakers' Yeast ^k	42-73	R(L)	56-71	80
		Bakers' Yeast ^l	11-54	S(D)	13-48	80
CH ₂ =CH(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	34	R(D)	>99	117
CH ₂ =CH(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	38	R(D)	>99	91
	Me	Bakers' Yeast	30	R(D)	92	91
	Et	Bakers' Yeast	54	R(D)	80	91
CH ₂ =CMe(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	55	R(D)	>99	91
	Me	Bakers' Yeast	18	R(D)	67	91
	Et	Bakers' Yeast	15	R(D)	18	91
CMe ₂ =CH(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	67	R(D)	>99	91
	Me	Bakers' Yeast	73	R(D)	92	91
	Et	Bakers' Yeast	12	R(D)	50	91
PhCH ₂ O(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	51	R(D)	>99	91
	Me	Bakers' Yeast	58	R(D)	60	81
MeO(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	11	S(L)	33	81
	Bu	Bakers' Yeast	48	S(L)	82	81
HO(CH ₂) ₂	Pen	Bakers' Yeast	59	S(L)	87	81

(表1-1 の続き)

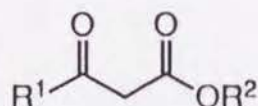
MeS(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	28	R(D)	20	81
PrS(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	71	S(L)	9	81
PhS(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	88	S(L)	41	81
TMS(CH ₂) ₂ S(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	41	R(D)	33	81
PhCH ₂ O(CH ₂) ₂	Me	Bakers' Yeast	65	S(L)	30	82
	CH ₂ CHMe ₂	Bakers' Yeast	70	S(L)	90	82
	Neopentyl	Bakers' Yeast	35	S(L)	96	82
<i>t</i> -BuOCOCH ₂	SEt ^h	Bakers' Yeast	32	—	46	83
<i>t</i> -BuOCO(CH ₂) ₂	SEt ^h	Bakers' Yeast	26	S(L)	84	83
PhSO ₂ CH ₂	Me	Bakers' Yeast	80	S(D)	98	84
EtSCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55	R(L)	70	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	8	S(D)	90	85
PrSCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	49	R(L)	65	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	12	S(D)	90	85
BuSCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67	R(L)	70	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	30	S(D)	90	85
PenSCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30	R(L)	58	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	28	S(D)	85	85
PhSCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42	R(L)	73	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	32	S(D)	88	85
<i>p</i> -ClC ₆ H ₄ SCH ₂	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	R(L)	50	85
		<i>Candida guilliermondii</i>	38	S(D)	80	85
	Me	Bakers' Yeast	16 ^m	S(D)	74	86
	Et	Bakers' Yeast	14 ^m	S(D)	50	86
	K	Bakers' Yeast	3 ^m	S(D)	86	86
	Oct	Bakers' Yeast	15 ^m	R(L)	14	86
	Et	<i>Candida albicans</i>	38	R(L)	85	87
	Et	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78	S(D)	95	87
		<i>Torulaspora delbrueckii</i>	58	S(D)	95	87
	Et	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	95	R(L)	85	87
	Et	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	100	R(L)	92	87

(表1-1 の続き)

PhS(CH ₂) ₂	K	Bakers' Yeast	8	S(D)	100	88
	Me	Bakers' Yeast	88	R(L)	42	88
		<i>Pichia terricola</i>	53	S(D)	94	88
		<i>Saccharomyces uvarum</i>	58	R(L)	69	88
Me	K	Bakers' Yeast	13	S(L)	86	93
Et	K	Bakers' Yeast	21	R(D)	98	93
Pr	K	Bakers' Yeast	34	R(D)	>98	93
Bu	K	Bakers' Yeast	69	R(D)	>98	93
Pen	K	Bakers' Yeast	71	R(D)	>98	93
Oct	K	Bakers' Yeast	51	R(D)	>98	93
Nonyl	K	Bakers' Yeast	19	R(D)	>98	93
Decyl	K	Bakers' Yeast	22	R(D)	>98	93
Undecyl	K	Bakers' Yeast	41	R(D)	>98	93
Tridecyl	K	Bakers' Yeast	56	R(D)	>98	93
Pentadecyl	K	Bakers' Yeast	44	R(D)	>98	93
Pentadecyl	K	Bakers' Yeast	40	R(D)	>98	92

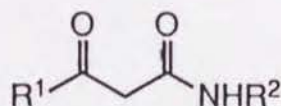
^a 変換率, ^b アルギン酸カルシウムで固定化, ^c アルギン酸カルシウムで固定化し有機溶媒を使用, ^d 重水中で反応, ^e アリルアルコールを添加, ^f ポリウレタンで固定化, ^g pH 8で反応, ^h チオールエステル, ⁱ ジチオエステル, ^j アミド, ^k 高基質濃度, ^l 低基質濃度, ^m 脱炭酸した化合物も生成

シブタン酸エチルが得られる事を報告している。得られた光学活性なヒドロキシエステルはフェロモン^{46,47,56-61}や抗生物質⁶²⁻⁶⁵などの生理活性物質の合成の重要な中間体として、多くの研究者に利用されている。ケトンの置換基としては、種々のアルキル基⁶⁶⁻⁷²ばかりでなくハロゲン⁷³⁻⁷⁷、窒素^{77,78}、酸素⁷⁹⁻⁸³、硫黄^{81,84-88}などで置換したβ-ケトエステルの還元も報告されている。

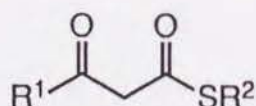


12

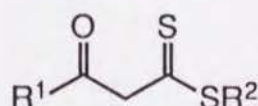
β-ケト酸の誘導体としてはエステルの他にもアミド^{78,89}13、チオールエステル^{83,90}14、ジチオエステル⁹⁰15の還元が報告されている。また、平間ら⁹¹はケトンの置換基が比較的長鎖のアルキル基の場合、ケトエステルを加水分解してカルボン酸のカリウム塩にするとR体のヒドロキシ酸が良好な不斉収率で得られる事を報告している。宇高ら^{92,93}はこの方法を用いて、長鎖の(R)-β-ヒドロキシ酸を高い不斉収率で得ている。



13



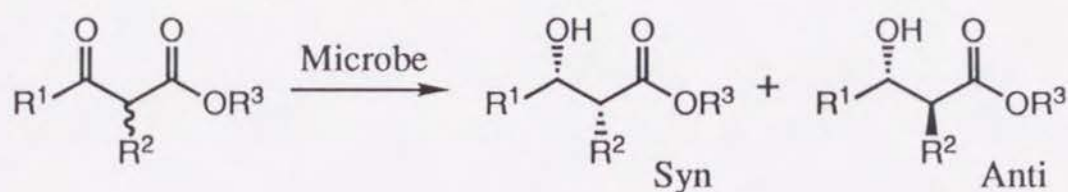
14



15

α位に置換基を有するβ-ケトエステル16の還元も種々の微生物を用いて行われている(表1-2)。通常の還元剤でこの基質を還元すると、四種類の立体異性体の混合物が得られる(図1-5)。また、この基質はα位の水素がケトンとエステルに隣接していて活性なため、エノール化を介して容易にラセミ化することができる。もしラセミ化の速度が還元速度より十分に速いとしたら、原料は常にラセミ体で存在し、生成物のα位の置換基に関するエナンチオマー比は、原料のエナンチオマーの反応性に一致する。このエナンチオマーの反応性の差が大きくなるような条件を選べば、四種類の生成物のうち一種類だけを選択的に合成する事が可能になる。この反応は一度に2点の不斉

表1-2 α -アルキル- β -ケト酸誘導体の還元



R ¹	Substrate		Microbe	Yield %	Syn:Anti	e.e.%		Ref.
	R ²	R ³				Syn	Anti	
H	Me	Et	Bakers' Yeast	70-80	2R	60-65		99
H	Et	Et	Bakers' Yeast	50-70	(+)	50		99
H	Me ₂ CH	Et	Bakers' Yeast	50-70	(-)	60		99
H	CH ₂ Ph	Et	Bakers' Yeast	50-70	(+)	46		99
H	Ph	Et	Bakers' Yeast	50-70	(+)	83		99
H	Me	Et	Bakers' Yeast	94	2R	45		100
		Neopentyl	Bakers' Yeast	78	2R	90		100
H	Me	Et	<i>Candida humicola</i>	>50	2R	98		101
H	Et	Et	<i>Aspergillus petrakii</i>	>50	2R	91		101
H	Me ₂ CH	Et	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	>50	2R	97		101
H	Ph	Et	<i>Streptomyces griseus</i>	>50	2R	96		101
H	CH ₂ Ph	Et	<i>Streptomyces hydrogenans</i>	>50	2R	99		101
Me	Me	Et	Bakers' Yeast	59	86 : 14	>97	>97	118
Me	Me	Et	Bakers' Yeast	75	83 : 17	>99	>99	95
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	40	55 : 45	>99	>99	95
		Oct	Bakers' Yeast	82	95 : 5	>99	>99	95
Me	Me	Et	Bakers' Yeast	65	75 : 25	100	100	119
Me	Allyl	Et	Bakers' Yeast	84	25 : 75	100	100	119
Me	CH ₂ Ph	Et	Bakers' Yeast	22	35 : 65	100	100	119
Me	Me	Et	<i>Geotrichum candidum</i>	70	4 : 96	—	97	97
Et	Me	Et	<i>Rhizopus arrhizus</i>	60	6 : 94	—	>99	97
Me	Me	CH ₂ Ph	Bakers' Yeast	44	67 : 33	>99	84	120
		<i>Candida albicans</i>	92	26 : 74	97	95		120
		<i>Pichia farinosa</i>	64	50 : 50	>99	>99		120
		<i>Rhodotorula glutinis</i>	22	94 : 6	97	87		120

(表1-2 の続き)

Me	Me	Et	Bakers' Yeast	59	87 : 13	>99	>99	96
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	85	72 : 28	>99	>99	96
		Neopentyl	Bakers' Yeast	57	96 : 4	>99	>99	96
Me	Et	Et	Bakers' Yeast	80	74 : 26	>99	>99	96
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	55	21 : 79	>99	>99	96
		Neopentyl	Bakers' Yeast	70	69 : 31	>99	>99	96
Me	Pr	Et	Bakers' Yeast	70	74 : 26	>99	>99	96
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	76	25 : 75	>99	>99	96
		Neopentyl	Bakers' Yeast	68	80 : 20	>99	>99	96
Me	Propargyl	Et	Bakers' Yeast	80	68 : 32	>99	>99	96
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	68	17 : 83	>99	>99	96
		Neopentyl	Bakers' Yeast	76	77 : 23	>99	>99	96
Me	Allyl	Et	Bakers' Yeast	59	35 : 65	>99	>99	96
		<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	36	6 : 94	>99	>99	96
		Neopentyl	Bakers' Yeast	66	56 : 34	>99	>99	96
Me	Allyl	Et	<i>Mucor javanicus</i>	82	90 : 10	>99	>99	121
Me	CH ₂ CH=CMe ₂	Et	Bakers' Yeast	29		>97	>97	122
Et	Me	3-Pen	<i>Pichia farinosa</i>	70	15 : 85	>95	55	123
Et	Me	3-Pen	<i>Pichia farinosa</i> ^a	65	14 : 86	>95	70	123
Bu	Me	K	Bakers' Yeast	32	1 : >99		>98 ^b	98
Pen	Me	K	Bakers' Yeast	63	1 : >99		>98 ^b	98
Hex	Me	K	Bakers' Yeast	68	1 : >99		>98 ^b	98
Oct	Me	K	Bakers' Yeast	28	1 : >99		>98 ^b	98
Me	OH	Et	Bakers' Yeast	68	28 : 72	90	>99	124
Et	OH	Et	Bakers' Yeast	72	10 : 90	69	97	124
Bu	OH	Et	Bakers' Yeast	60	20 : 80	70	97	124
Me	OCOPh	Et	Bakers' Yeast	70	14 : 86	>95	>95	125
Me	OCOPh	Et	Bakers' Yeast ^c	70	6 : 94	>95	>95	125
Me	SMe	Me	Bakers' Yeast	72	72 : 28	>96	>96	126
Me	SMe	Et	Bakers' Yeast	62	59 : 41	>96	>96	126
Me	SMe	<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	75	41 : 59	>96	>96	126
Me	SPh	Me	Bakers' Yeast	40	83 : 17	>96	>96	126
Me	SPh	Et	Bakers' Yeast	49	73 : 27	>96	>96	126
Et	SMe	Et	Bakers' Yeast	44	47 : 53	>96	>96	126

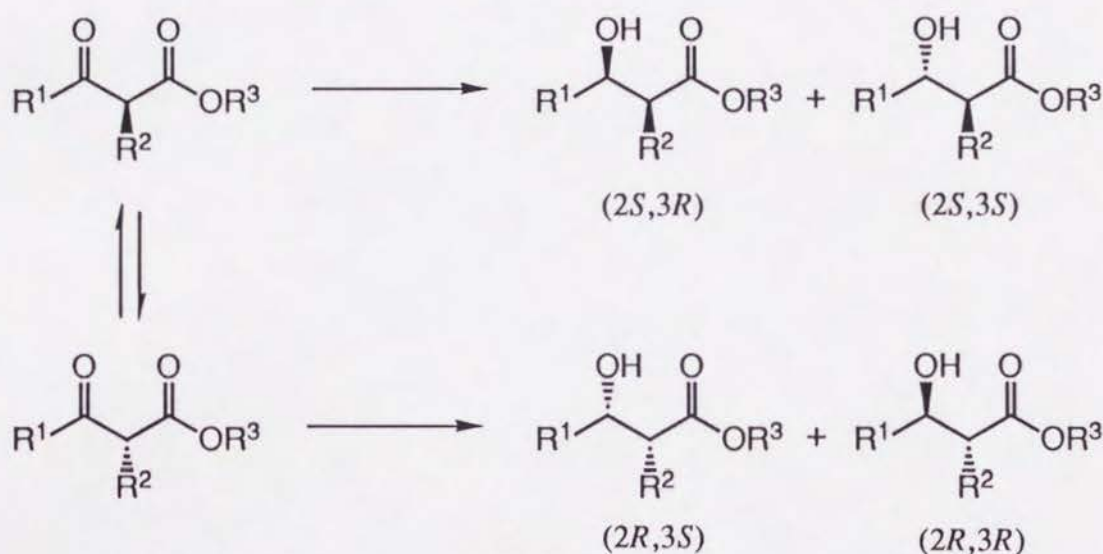
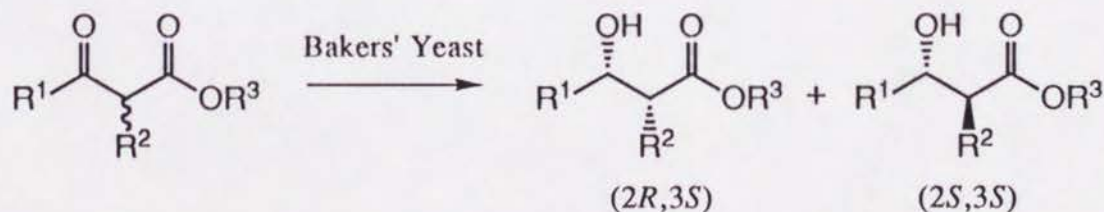
(表1-2 の続き)

BzO(CH ₂) ₂	SMe	Et	Bakers' Yeast	30	32 : 68	>96	>96	126
Me	Me	SEt ^d	Bakers' Yeast	77	81 : 19	>96		90
Me	Me	SSMe ^e	Bakers' Yeast	65	94 : 6	>96	>96	90
Me	Cl	Et	Bakers' Yeast	68	50 : 50	>99	>99	127
Me	NHCOMe	Et	<i>Saccharomyces rouxii</i>	32	40 : 60			128
BzOCH ₂	Me	Me	Bakers' Yeast	50	10 : 90	68 ^b	6 ^f	129
			<i>Geotrichum candidum</i>	66	2 : 98	60 ^b	96 ^f	129
BzOCH ₂	Me	Et	Bakers' Yeast	46	54 : 46	36 ^b	24	129
			<i>Curvularia lunata</i>	20	5 : 95		96 ^f	129
			<i>Geotrichum candidum</i>	70	2 : 98		90 ^f	129
BzOCH ₂	Me	Me ₂ CH	Bakers' Yeast	64	24 : 76	96 ^b	50	129
			<i>Curvularia lunata</i>	52	31 : 69	80	92 ^f	129
MeO ₂ C	Me	Me	Bakers' Yeast	57	53 : 47	65	20	130
MeO ₂ C	Me	Et	Bakers' Yeast	85	43 : 57	79	31	131
			<i>Candida albicans</i>	84	55 : 45	>99	77	131
Furyl	Me	Me	<i>Candida albicans</i>	23	0 : >99		>99	132
Furyl	Me	Me	<i>Kloeckera saturnus</i>	29	47 : 53	68 ^g	46 ^h	133
				72	54 : 46	83 ^g	73 ^h	134
			<i>Saccharomyces delbrueckii</i>	43	39 : 61	90	91	133
				12	33 : 67	98	97	134
			<i>Saccharomyces fermentati</i>	21	40 : 60	84	86	133
				57	49 : 51	>99	>99	134
Furyl	Me	Me	<i>Saccharomyces fermentati</i>	21	40 : 60	84	86	135
			<i>Saccharomyces fermentati</i> ⁱ	36	48 : 52	94	96	135
			<i>Saccharomyces fermentati</i> ^j	15	38 : 62	66	68	135
PhCH=CH	Me	Et	<i>Candida albicans</i>	45	78 : 22	97	97	135
			<i>Candida albicans</i> ⁱ	64	75 : 25	96	>99	135
			<i>Candida albicans</i> ^j	26	62 : 38	>99	>99	135
Thienyl	Me	Me	<i>Kloeckera saturnus</i>	38	44 : 56	85 ^g	79 ^h	136
			<i>Saccharomyces salmonicolor</i>	17	35 : 65	88	95	136
PhCH=CH	Me	Et	<i>Candida albicans</i>	45	78 : 22	97		137
Me	(S)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	52	(2S,3S)	>99		138
Et	(S)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	43	(2S,3S)	>99		138
Pr	(S)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	37	(2S,3S)	>99		138

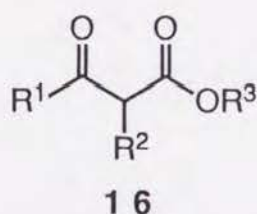
(表1-2 の続き)

Me	(R)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	39	(2R,3S)	>98	138
Et	(R)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	54	(2R,3S)	>98	138
Me ₂ CH	(R)-F,Me	Et	Bakers' Yeast	41	(2R,3S)	>98	138

^a 培養しながら反応, ^b (2R,3R), ^c アルギン酸カルシウムで固定化, ^d チオールエステル, ^e ジチオエステル, ^f (2R,3R), ^g (2S,3S), ^h (2R,3S), ⁱ ポリウレタンで固定化, ^j 光架橋性樹脂で固定化

図1-5 α -アルキル- β -ケトエステルの還元図1-6 パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステルの還元

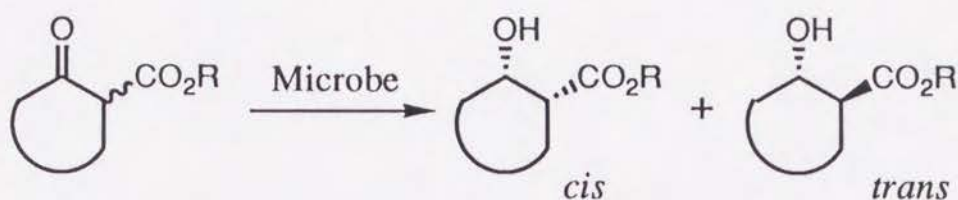
中心を有するヒドロキシエステルを得る反応である事から、エナンチオ選択的かつジアステレオ選択的な反応が実現すれば、有効な不斉合成法と成り得る。パン酵母による還元⁹⁴では、一般的に β 位の水酸基の立体配置はS体だけが選択的に得られるが、 α 位の立体配置に関しては余り良い結果が得られず、シン体とアンチ体の混合物が得られる(図1-6)。中村ら^{95,96}はエステルのかさ高さを変える事によってシン体(正式にはエリトロ体)とアンチ体(正式にはトレオ体)の作り分けに成功している。Azeradら⁹⁷は微生物を*Geotrichum candidum*や*Rhizopus arrhizus*に変える事によってアンチ体のみを選択的に、宇高ら⁹⁸はエステルを加水分解しカルボン酸のカリウム塩にすることで(2*R*,3*R*)のアンチ体を選択的に、また藤沢ら⁹⁰はエステルをジチオエステルに変える事によってシン体を選択的に得られる事を報告している。しかしこの種の基質に関してはまだまだ選択的な反応例は少なく、ジアステレオマーをクロマトグラフィー等によって分離精製して使用しているのが現状である。今後の高選択的な反応の開発に期待したい。

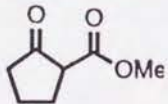
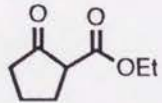
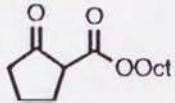
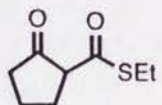
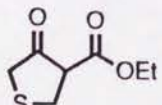
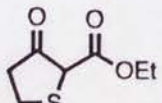
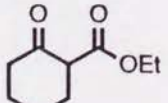


α -ホルミルエステル**17**も α -アルキル- β -ケトエステルと同様にパン酵母を用いて還元することが出来る。この基質の場合還元される位置での不斉は生じないが、先程と同様に α 位に不斉が生じる。2-メチル-3-オキソプロピオン酸エチルをパン酵母で還元すると、得られるヒドロキシエステルの立体選択性は余り良くないことがSeebachら⁹⁹によって報告されているが、中村ら¹⁰⁰はこれをネオペンチルエステルとして反応させることによって不斉収率を向上させている。Matzingerら¹⁰¹は微生物をスクリーニングして種々の α -ホルミルエステルの立体選択的な還元を報告している。

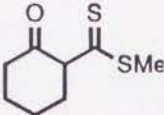
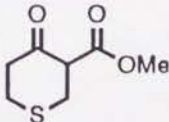
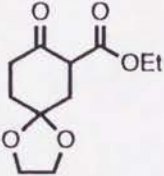
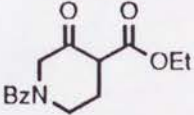
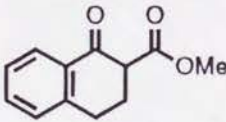
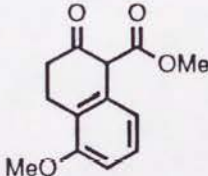
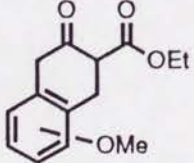
同様に α 位に置換基を有する β -ケトエステルでも、環状の化合物**18**を用いると立体的に規制しやすくなり、パン酵母還元では^{44,102}シス体(シン体)のヒドロキシエステルが選択的に得られるようになる(表1-3)。微生物として

表1-3 環状のβ-ケト酸誘導体の還元

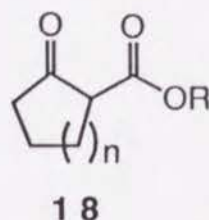
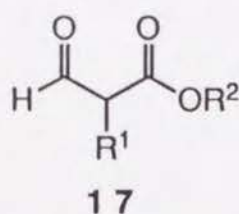


Substrate	Microbe	Yield %	Config.	d.e. %	e.e. %	Ref.
	Bakers' Yeast	35	<i>cis</i>	86	94	139
	Bakers' Yeast	44	<i>cis</i>	>99	>99	102
	Bakers' Yeast	50	<i>cis</i>	94	89	139
	<i>Geotrichum candidum</i>		<i>cis</i>	100	>99	103
	<i>Mucor racemosus</i>		<i>cis</i>	100	>99	103
	<i>Mucor circinelloides</i>		<i>cis</i>	100	>99	103
	<i>Rhizopus arrhizus</i>		<i>trans</i>	74	>99	103
	Bakers' Yeast	62	<i>cis</i>	100	>96	139
	Bakers' Yeast	88	<i>cis</i>	100	>96	139
	Bakers' Yeast		<i>cis</i>		85	140
	Bakers' Yeast	62	<i>cis</i>		>95	140,141
	Bakers' Yeast	65	<i>cis</i>	100	86	142
	Bakers' Yeast	72-85	<i>cis</i>	>99	>99	102
	<i>Kloeckera magna</i>		<i>cis</i>	100	>99	103
	<i>Mucor racemosus</i>		<i>cis</i>	96	96	103
	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>		<i>trans</i>	90	>99	103

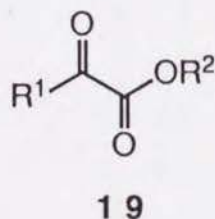
(表1-3 の続き)

	Bakers' Yeast	27	<i>cis</i>	100	>96	90
	Bakers' Yeast	71	<i>cis</i>	96	>85	140
	Bakers' Yeast	74	<i>cis</i>		98	143
	Bakers' Yeast	86	<i>cis</i>	>99	>99	102
	Bakers' Yeast	65	<i>cis</i>	73	>95	102
	Bakers' Yeast	12	<i>cis</i>	>98	72	102
	Bakers' Yeast	67	<i>cis</i>	>98	75	102
	Bakers' Yeast	63-70	<i>cis</i>	>89	67-78	102

*Rhizopus arrhizus*を用いると¹⁰³、トランス体（アンチ体）を選択的に合成することもできるが、ジアステレオ選択性はそれほど高くない。

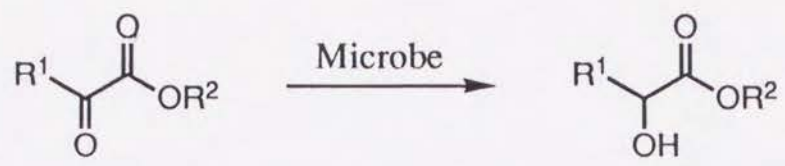


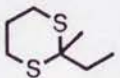
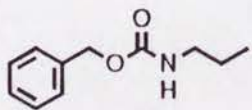
α -ケトエステル**19**は水溶液中で比較的不安定なために、単純なアルキル置換体を基質とする反応についてはほとんど研究されていない。ピルビン酸エチルの還元に関する報告^{44,104}があるだけである（表1-4）。しかし、かさ高い置換基であるフェニル基⁴⁴やイソプロピル基¹⁰⁵を有する α -ケトエステルではその不安定さが解消され、*R*体のヒドロキシエステルが高い不斉収率で得られている。また、宇高ら¹⁰⁶は β 位を塩素で置換した化合物を用いると2*S*体のヒドロキシエステルが選択的に得られることを報告しているが、ジアステレオ選択性は良くない。環状のケトンで置換基に有する α -ケトエステルの還元も報告されているが^{147,148}、この基質の場合は α 位のケトンしか還元されない。



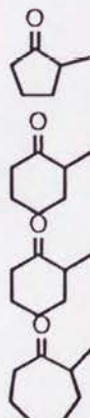
γ -ケト酸の誘導体**20**もパン酵母で還元されるが、エステル¹⁰⁷では選択性が悪い（表1-5）。宇高ら¹⁰⁸はこれをケト酸として反応させると選択性が向上し、(*R*)-体が選択的に得られることを報告している。そして生成したヒドロキシ酸は系中でラクトン化し、フェロモン的一种である光学活性なラクトンを与える^{108,149}。 δ -ケト酸**21**に関しても同様の報告があるが、この場合はエステルでも不斉収率は高い^{108,109}（表1-6）。また、9-オキソデカン酸**22**も κ -カラギーナンで固定化したパン酵母で還元され^{110,111}、*S*体のヒドロキシ

表1-4 α - ケ ト 酸 誘 導 体 の 還 元



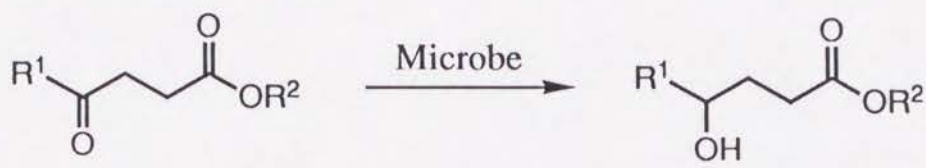
Substrate		Microbe	Yield %	Config. %	e.e.	Ref.
R ¹	R ²					
Me	Et	Bakers' Yeast	49	R	85 ^a	44
Ph	Me	Bakers' Yeast	59	R	98 ^a	44
Ph	NH ₂ ^b	Bakers' Yeast	70	R	100 ^a	44
PhCH ₂	Me	Bakers' Yeast	44	—	0	44
Me	Et	Bakers' Yeast	47	S	91	104
		Bakers' Yeast ^c	33	S	94	104
Et	Et	Bakers' Yeast	42	S	75	104
		Bakers' Yeast ^c	28	S	36	104
Pr	Et	Bakers' Yeast	36	S	31	104
		Bakers' Yeast ^c	27	S	32	104
Bu	Et	Bakers' Yeast	29	S	50	104
		Bakers' Yeast ^c	41	R	47	104
Pen	Et	Bakers' Yeast	23	S	30	104
		Bakers' Yeast ^c	36	R	54	104
Me ₂ CH	Bu	Bakers' Yeast	41	R	16	105
		Bakers' Yeast ^c	49	R	93	105
Ph	Et	Bakers' Yeast ^d	42-66	R	91-94	51
	Me	Bakers' Yeast	80	R	64	144
		<i>Torulopsis</i> sp.	15	R	>99	144
		<i>Pichia membranaefaciens</i>	34	S	32	144
	Me	Bakers' Yeast	47	S	49	145
		<i>Rhodotorula rubra</i>	43	S	46	145
		<i>Candida utilis</i>	57	R	11	145
PrCHCl	Et	Bakers' Yeast	17	2S,3S	92	106
			57	2S,3R	86	106
ⁱ PrCHCl	Et	Bakers' Yeast	15	2S,3S	>95	106
			47	2S,3R	>95	106

(表1-4 の続き)

BuCHCl	Et	Bakers' Yeast	22	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			45	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
ⁱ BuCHCl	Et	Bakers' Yeast	6	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			50	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
PenCHCl	Et	Bakers' Yeast	13	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			54	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
HexCHCl	Et	Bakers' ^o Yeast	32	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			53	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
HepCHCl	Et	Bakers' Yeast	26	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			47	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
DecylCHCl	Et	Bakers' Yeast	36	2 <i>S</i> ,3 <i>S</i>	>95	106
			39	2 <i>S</i> ,3 <i>R</i>	>95	106
PhCHMe	Me	Bakers' Yeast	23	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	91	146
			39	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	47	146
		<i>Hansenula anomala</i>	19	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	79	146
			25	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	94	146
		<i>Lipomyces starkeyi</i>	13	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i>	>99	146
			2	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>	58	146
	Et	Bakers' Yeast	30	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ^e	76	147
			44	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ^f	88	147
	Me	Bakers' Yeast	38	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ^e	>95	147
			13	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ^f	>95	147
	Et	Bakers' Yeast	51	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ^e	99	147,148
			6	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ^f	99	147,148
	Et	Bakers' Yeast	20	2 <i>R</i> ,3 <i>S</i> ^e	12	147
			14	2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ^f	60	147

^a 光学純度, ^b アミド, ^c ポリウレタンで固定化しヘキサン中で反応, ^d アルギン酸カルシウムで固定化, ^e 文献147では(α *R*,1*S*)と表記, ^f 文献147では(α *R*,1*R*)と表記

表1-5 γ -ケト酸誘導体の還元




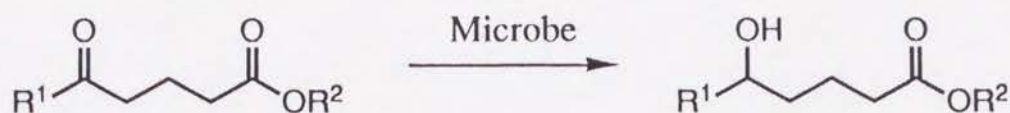
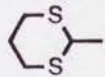
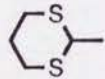
Substrate		Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
R ¹	R ²					
Et	Me	Bakers' Yeast	44	R	83	107
Oct	Me	Bakers' Yeast	41	R	94	107
Undecyl	Me	Bakers' Yeast	29	R	57	107
Et	H	Bakers' Yeast	13	R	>98	108
Pr	H	Bakers' Yeast	23	R	>98	108
Bu	H	Bakers' Yeast	42	R	>98	108
Pen	H	Bakers' Yeast	79	R	>98	108
Oct	H	Bakers' Yeast	71	R	>98	108
Undecyl	H	Bakers' Yeast	50	R	>98	108
Tridecyl	H	Bakers' Yeast	31	R	>98	108
MeOCO(CH ₂) ₂	H	Bakers' Yeast	25	R	98	149
EtOCO(CH ₂) ₂	H	Bakers' Yeast	54	R	98	149
PrOCO(CH ₂) ₂	H	Bakers' Yeast	45	R	98	149
BuOCO(CH ₂) ₂	H	Bakers' Yeast	54	R	98	149
	Me	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58	R	>95	150
		<i>Rhizopus microsporus</i>	28	S	>95	150

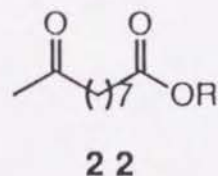
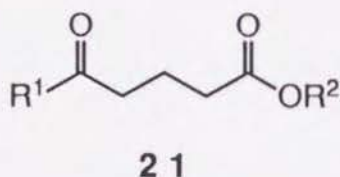
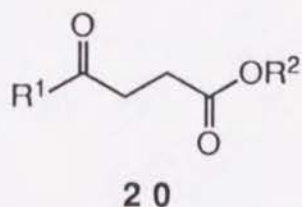
表1-6 δ -ケト酸誘導体の還元



Substrate		Microbe	Yield %	Config. %	e.e.	Ref.
R ¹	R ²					
Et	H	Bakers' Yeast	6	R	>98	108
Pr	H	Bakers' Yeast	64	R	>98	108
Bu	H	Bakers' Yeast	68	R	>98	108,109
Pen	H	Bakers' Yeast	55	R	>98	108
Oct	H	Bakers' Yeast	54	R	>98	108,109
Undecyl	H	Bakers' Yeast	40	R	>98	108,109
Tridecyl	H	Bakers' Yeast	17	R	>98	108
Et	Et	Bakers' Yeast	11	R	>98	108
Pr	Me	Bakers' Yeast	46	R	>98	108
Pr	Et	Bakers' Yeast	58	R	>98	108
Bu	Et	Bakers' Yeast	71	R	>98	108
Oct	Et	Bakers' Yeast	21	R	>98	108
Oct	H	Bakers' Yeast ^a	26	R	100	151
Undecyl	H	Bakers' Yeast ^a	32	R	100	151
	<i>t</i> -Bu	Bakers' Yeast	65	S	>97	152
	Me	<i>Kloeckela corticis</i>	40	S	>98	153
6-Keto Ester						
(MeO) ₂ CHCH ₂	Me	Bakers' Yeast ^b	60	S	>99	154
9-Keto Ester						
Me	H	Bakers' Yeast ^a	46	S	96	110,111

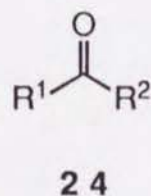
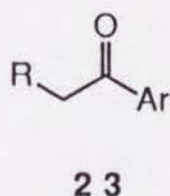
^a カラギーナンで固定化, ^b アルギン酸カルシウムで固定化

酸が得られている (表1-6)。



1.3.2.2 芳香族ケトンの還元

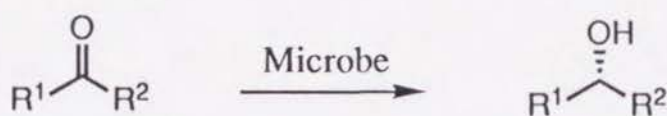
芳香族ケトン**23**では、ベンゾフェノンのパン酵母による還元⁴³は古くから知られているが、選択性は悪い (表1-7)。Zifferら¹⁵⁵はパン酵母の代わりに *Cryptococcus macerans* で反応を行うと、高い不斉収率でフェネチルアルコールが得られる事を報告している。またこの微生物は塩化フェナシルや臭化フェナシルの還元¹⁵⁶にも有効である。その他にはアセチルピリジン^{157,160,161}やアセチルフラン¹⁵⁷の還元も報告されている。また、ベンゾフェノンのクロム錯体を還元したという報告例¹⁵⁸もある。 α 位に水酸基を有するケトンもパン酵母で還元され¹⁵⁹、高い不斉収率でR体のジオールが得られているが、この水酸基をエステルに変換して反応させると立体選択性が逆転しS体のアルコールが得られるのは興味深い。

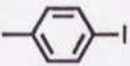


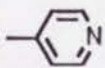



1.3.2.3 脂肪族ケトンの還元

脂肪族ケトン**24**の場合、単純なジアルキルケトンの還元はほとんど報告例がなく、不飽和結合を含むもの^{165,166-169}やフッ素原子を含んだもの^{75,164}が数例報告されているだけである (表1-8)。一方、ヘテロ原子を置換基に有する化合物についての報告は非常に数が多い。とりわけ硫黄官能基を有するケトンの還元は最も例が多く、スルフィド¹⁷⁰⁻¹⁷³、スルホキシド¹⁷⁰、スルホニ

表1-7 芳香族ケトンの還元

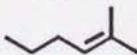
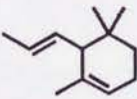


Substrate		Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
R ¹	R ²					
Me	Ph	Bakers' Yeast	15-45	S	61-89 ^a	43
		<i>Cryptococcus macerans</i>	90	S	100 ^a	155
Me		Bakers' Yeast	30	S	96	84
Me		Bakers' Yeast	36	S	96	157
		<i>Cryptococcus macerans</i>	—	S	85	160
Me		Bakers' Yeast	40	S	67	157
		<i>Cryptococcus macerans</i>	—	S	82	160
		<i>Sporotrichum exile</i>	60	S	>99	161
Me		Bakers' Yeast	18	S	96	157
			79	S	96	162
		<i>Cryptococcus macerans</i>	—	S	79	160
Me		Bakers' Yeast	28	S	15	157
Me	PhCr(CO) ₃	Bakers' Yeast	96	S	>99	158
Et	PhCr(CO) ₃	Bakers' Yeast	20	S	87	158
FCH ₂	Ph	Bakers' Yeast	67	R	97	163
ClCH ₂	Ph	Bakers' Yeast	37	R	90	163
BrCH ₂	Ph	Bakers' Yeast	9	R	97	163
ClCH ₂	Ph	<i>Cryptococcus macerans</i>	80	R	100 ^a	156
BrCH ₂	Ph	<i>Cryptococcus macerans</i>	80	R	93 ^a	156
HOCH ₂	Ph	Bakers' Yeast	85	R	94	159
MeCO ₂ CH ₂	Ph	Bakers' Yeast	70	S	94	159
EtCO ₂ CH ₂	Ph	Bakers' Yeast	50	S	91	159
CF ₃	Ph	Bakers' Yeast	>80 ^b	R	44 ^a	164
CF ₃	α-Naphthyl	Bakers' Yeast	>80 ^b	R	66 ^a	164
CF ₃	β-Naphthyl	Bakers' Yeast	>80 ^b	R	60 ^a	164

^a 光学純度, ^b 変換率

表1-8 脂肪族ケトンの還元

$$\text{R}^1-\overset{\text{O}}{\overset{\parallel}{\text{C}}}-\text{R}^2 \xrightarrow{\text{Microbe}} \text{R}^1-\overset{\text{OH}}{\underset{\mid}{\text{C}}}-\text{R}^2$$

R ¹	Substrate R ²	Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
CF ₃	Cyclohexyl	Bakers' Yeast	>80 ^b	R	>99 ^a	164
Me	C ₃ F ₇	Bakers' Yeast	68	(-)	87	75
Me	C ₇ F ₁₅	Bakers' Yeast	74	(-)	91	75
Me	(CH ₂) ₃ C≡CH	Bakers' Yeast	56	S	>99	165
Me		Bakers' Yeast	80 ^b	S	94	166
		<i>Thermoanaerobium Brockii</i>	100 ^b	S	>99	166
		<i>Aspergillus niger</i>	80 ^b	R	96	166
		<i>Pichia Miso</i>	59	R	88	167
Pen	CH=CHC≡C(CH ₂) ₇ CO ₂ Me					
		<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	32	S	>99	168
		<i>Shizosaccharomyces octosporus</i>	26	S	>99	168
Me		<i>Pichia Miso</i>	15	2R	52	169

^a 光学純度, ^b 変換率

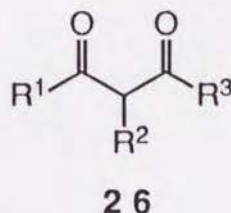
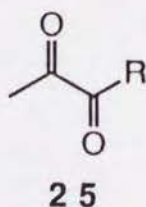
ル基^{84,170-176}、ジチアニル基^{112,177-181}など、多様な置換基を有するケトンの立体選択的還元反応が報告されている(表1-9)。窒素官能基としては、ニトロ基^{184,185}、イミド¹⁸⁴、アジド¹⁸⁶を置換基とするケトンの還元の研究がある(表1-10)。また、酸素官能基を有するケトンについても幾つか報告例がある^{176,179-181,186,190-195}(表1-11)。そして、これらの反応によって得られた種々の光学活性なアルコールはフェロモン等の生理活性化合物の合成に利用されている^{172,174,196,197}。

環状のケトンについても報告があるが^{158,198-200}、そのほとんどは硫黄官能基を含むものである(表1-12)。また、インダノンのクロム錯体を還元したという報告もある¹⁵⁸。

1.3.2.4 ジケトンの還元

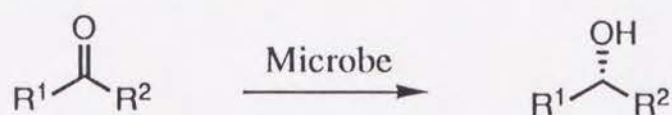
α -ジケトン**25**の場合、一方の置換基はメチル基であるものが多く、パン酵母で還元するとこのメチル基側のケトンが先に還元され、*S*体のアルコールが得られる²⁰¹⁻²⁰⁴(表1-13)。これを長時間反応させると、両方のケトンが還元されジオールが得られる²⁰³。一方、同じ基質を*Beauveria sulfurescens*で還元すると²⁰¹もう一方のケトンの方から先に還元されるという報告があり、興味深い。また、ベンジルを還元し光学活性なベンゾインを得ている例^{205,206}もある。

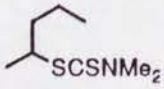
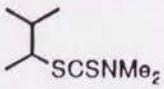
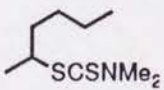
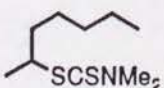
β -ジケトン**26**の還元も多数報告がある²⁰⁷⁻²¹⁴が、これらは全て一方のケトンしか還元されていない(表1-14)。微生物として*Aspergillus niger*や*Geotrichum candidum*を用いると^{210,211,214}、パン酵母とは逆の立体配置をもつヒドロキシケトンを得ることが出来る。



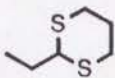

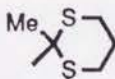
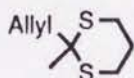

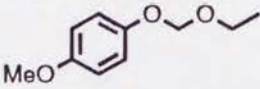


また、 γ -ジケトン**27**の還元は正宗ら²¹⁵によって一例だけ報告されている。これは β -ジケトンと異なり、両方のケトンが還元されて(2*S*,5*S*)体のジオ

表1-9 硫黄官能基を有するケトンの還元




Substrate		Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
R ¹	R ²					
Me	CH ₂ SPh	Bakers' Yeast	21	S	94 ^a	170
Me	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	73	S	94 ^a	170
Me	CH ₂ SOPh	Bakers' Yeast	47	S _C R _S ^b	95 ^a	170
Me	(CH ₂) ₂ SO ₂ Tol	Bakers' Yeast	68	S	98	14
Me	(CH ₂) ₃ SO ₂ Tol	Bakers' Yeast	44	S	98	14
Me	(CH ₂) ₄ SO ₂ Tol	Bakers' Yeast	6	S	81	14
Et	(CH ₂) ₂ SO ₂ Tol	Bakers' Yeast	34	S	67	14
Et	(CH ₂) ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	37	S	22	14
Ph	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	84	S	92	84
FCH ₂	CH ₂ SO ₂ Tol	Bakers' Yeast	84	S	>97	171
FCH ₂	CH ₂ STol	<i>Aspergillus niger</i>	90	S	93	171
ClCH ₂	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	85	R	84	175
HOCH ₂	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	87	S	99	176
HO(CH ₂) ₂	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	42	S	94	176
HO(CH ₂) ₃	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	74	S	93	176
HO(CH ₂) ₄	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	39	S	96	176
HO(CH ₂) ₅	CH ₂ SO ₂ Ph	Bakers' Yeast	84	S	72	176
HOCH ₂	CH ₂ SPh	Bakers' Yeast	90	S	78	172
Me	CH ₂ SCSNMe ₂	Bakers' Yeast	91	S	>96	182
Pen	CH ₂ SCSNMe ₂	Bakers' Yeast	39	S	>96	182
Me	CHMeSCSNMe ₂	Bakers' Yeast	82	S	>96	182
H		Bakers' Yeast	92	R	55	182
H		Bakers' Yeast	69	R	32	182
H		Bakers' Yeast	78	R	46	182
H		Bakers' Yeast	75	R	63	182

(表1-9 の続き)

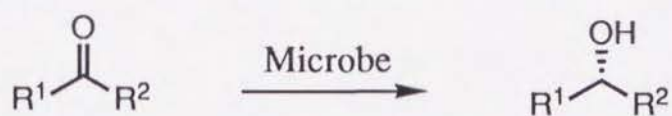
Me		Bakers' Yeast	90	S	>99	177
		<i>Geotrichum candidum</i>	66 ^c	S	74	112
		<i>Geotrichum candidum</i>	96 ^c	R	82	112
		<i>Aspergillus niger</i>	95 ^c	R	84	112
		<i>Streptomyces</i> sp.	64	R	99	178
Me		Bakers' Yeast	84	S	>96	179
Et		Bakers' Yeast	71	S	>96	179
Pr		Bakers' Yeast	92	S	>96	179
Bu		Bakers' Yeast	71	S	>96	179
HO(CH ₂) ₃		Bakers' Yeast	74	S	>96	179
Me		Bakers' Yeast	50	S	>96	179
Me		Bakers' Yeast	31	S	>96	179
MeOCH ₂		Bakers' Yeast	73	S	>95	180
EtOCH ₂		Bakers' Yeast	52	S	>95	180
HexOCH ₂		Bakers' Yeast	38	S	>95	180
CF ₃ OCH ₂		Bakers' Yeast	96	S	67	180
BzOCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	50	S	>95	180
		Bakers' Yeast	27	S	>98	180
THPOCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	37	S	>95	180
MeOCH ₂ OCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	82	S	>95	180
HOCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	28	S	>95	180
AcOCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	58	S	87	180
MeOCH ₂		Bakers' Yeast	50	S	>95	180
HexOCH ₂		Bakers' Yeast	28	S	28	180
AcOCH ₂ OCH ₂		Bakers' Yeast	29	S	88	180
Me		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98	S	>95	150
		<i>Yarrowia lipolytica</i>	17	R	>95	150
Me ₂ CH		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	61	S	80	150
		<i>Rhizopus oryzae</i>	92	R	>95	150
Cl ₂ CH		<i>Rhizopus microsporus</i>	90	S	>95	150
		<i>Trichoderma viride</i>	98	R	>95	150

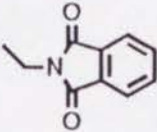
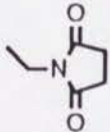
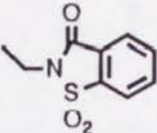
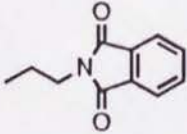
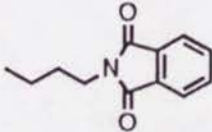
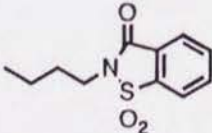
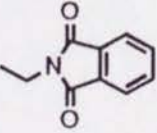
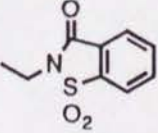
(表1-9 の続き)

$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_8$		<i>Candida steatolytica</i>	37	S	56	150
Me	$\text{CH}(\text{STol})_2$	Bakers' Yeast	50	S	95	181
FCH_2	$\text{CH}(\text{STol})_2$	Bakers' Yeast	42	S	95	181
$\text{MeOCH}_2\text{OCH}_2$	$\text{CH}(\text{STol})_2$	Bakers' Yeast	50	S	95	181
CF_3	$\text{CH}(\text{STol})_2$	Bakers' Yeast	25	S	95	181
Ph	SiMe_3	Bakers' Yeast	10-30	S	73-90	183
FCH_2	CH_2STol	Bakers' Yeast	70-80	S	>85	173
FCH_2	CHMeSTol	Bakers' Yeast	28-32	2S3S	20	173
			42-48	2S3R	50	173
FCH_2	CHAllylSTol	Bakers' Yeast	28-32	2R3R	46	173
			42-48	2R3S	30	173
FCH_2	CHPhSTol	Bakers' Yeast	46-52	2R3R	74	173
			24-28	2R3S	76	173
FCH_2	$\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Tol}$	Bakers' Yeast	70-80	S	>80	173
FCH_2	$\text{CHMeSO}_2\text{Tol}$	Bakers' Yeast	32-36	2S3S	32	173
			38-44	2S3R	21	173
FCH_2	$\text{CHAllylSO}_2\text{Tol}$	Bakers' Yeast	28-32	2R3R	18	173
			42-48	2R3S	8	173
FCH_2	$\text{CHPhSO}_2\text{Tol}$	Bakers' Yeast	28-32	2R3R	>80	173
			42-48	2R3S	>80	173


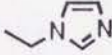
^a 光学純度, ^b 58% d.e., ^c 変換率

表1-10 窒素官能基を有するケトンの還元



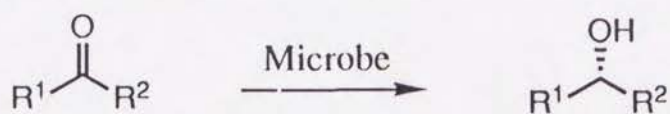
R ¹	Substrate R ²	Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
Me	(CH ₂) ₂ NO ₂	Bakers' Yeast	40-50	S	98	185
Me	(CH ₂) ₃ NO ₂	Bakers' Yeast	60	S	94	185
Me	CMe ₂ NO ₂	Bakers' Yeast	57	S	>96	184
Me		Bakers' Yeast	74	S	94	184
Me		Bakers' Yeast	48	S	>96	184
Me		Bakers' Yeast	81	S	>96	184
Me		Bakers' Yeast	94	S	95	184
Me		Bakers' Yeast	41	S	45	184
Me		Bakers' Yeast	52	S	75	184
Et		Bakers' Yeast	9	S	15	184
Et		Bakers' Yeast	54	S	>96	184

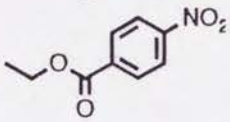
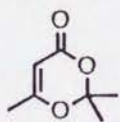
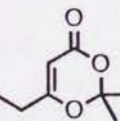
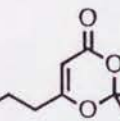
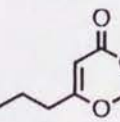
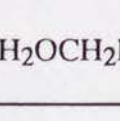
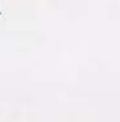
(表1-10 の続き)

$\text{CH}_3\text{SO}_2\text{NH}-$ 		<i>Kloeckera magna</i>	69	<i>R</i>	100	187
Me	CH_2CN	Bakers' Yeast	30 ^a	2 <i>S</i> 3 <i>S</i>	>99	188
			58 ^a	2 <i>R</i> 3 <i>S</i>	>99	188
Me	CHMeCN	Bakers' Yeast	39	2 <i>S</i> 3 <i>S</i>	82	189
			30	2 <i>R</i> 3 <i>S</i>	74	188
Me	CHEtCN	Bakers' Yeast	25	2 <i>S</i> 3 <i>S</i>	>98	188
			21	2 <i>R</i> 3 <i>S</i>	>98	188
Me	CHBuCN	Bakers' Yeast	25	2 <i>S</i> 3 <i>S</i>	>98	188
			18	2 <i>R</i> 3 <i>S</i>	—	188
Me	CHPhCN	Bakers' Yeast	61	2 <i>S</i> 3 <i>S</i>	>98	188

^a 2-エチル-3-ヒドロキシブチロニトリルが生成

表1-11 酸素官能基を有するケトンの還元



R ¹	Substrate R ²	Microbe	Yield %	Config.	e.e. %	Ref.
Me	CH ₂ OCH ₂ Ph	Bakers' Yeast	76	<i>S</i>	>90	190
Me	(CH ₂) ₂ OCH ₂ Ph	Bakers' Yeast	52	<i>S</i>	>95	190
N ₃ CH ₂	CH ₂ OCOMe	Bakers' Yeast	70	<i>S</i>	>96	186
N ₃ CH ₂	CH ₂ OCOPh	Bakers' Yeast	95	<i>S</i>	78	186
N ₃ CH ₂	CH ₂ OCOt-Bu	Bakers' Yeast	74	<i>S</i>	90	186
HOCH ₂	Pen	Bakers' Yeast	60	<i>R</i>	100 ^a	191
HOCH ₂	CH ₂ OCOPh	Bakers' Yeast	99	<i>S</i>	>99	192
HOCH ₂		Bakers' Yeast	99	<i>S</i>	>99	192
HOCH ₂	(CH ₂) ₂ CH=CMe ₂	Bakers' Yeast	68	<i>R</i>	97	193
HOCH ₂	(CH ₂) ₂ CH=CH ₂	Bakers' Yeast	47	<i>R</i>	99	193
Me		Bakers' Yeast	90	<i>S</i>	91	194
Et		Bakers' Yeast	53	^b	43	194
Me		Bakers' Yeast	44	<i>S</i>	90	194
Me		Bakers' Yeast	23	^b	>98	194
			58	<i>S</i>	>99	195
Me		Bakers' Yeast	15	<i>S</i>	94	195
MeCO ₂ CH ₂	CH ₂ OCH ₂ Ph	Bakers' Yeast	99	<i>R</i>	>99	192

^a 光学純度, ^b 未決定

表1-12 環状のケトンの還元

Substrate	Microbe	Product	Yield, %	Config.	e.e., %	Ref.
	Bakers' Yeast		47	cis 100%	>99	198
	Bakers' Yeast		60	cis 100%	>99	198
	Bakers' Yeast		59	cis 90%	>99	198
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		93	S	87	199
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		91	S	99	199
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		92	S	97	199
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		81	S	92	199
	<i>Cryptococcus macerans</i>		27	S	>98	200
	<i>Cryptococcus macerans</i>		47	S	>99	200

(表1-12 の続き)

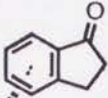
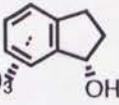
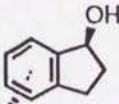
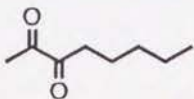
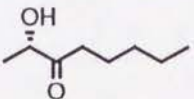
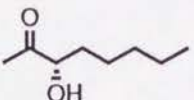
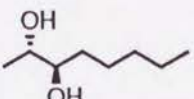
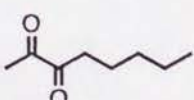
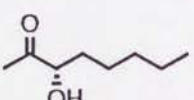
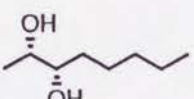
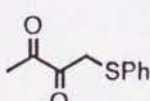
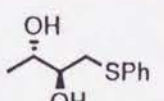
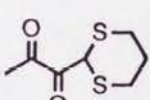
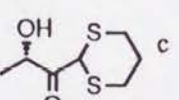
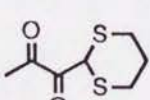
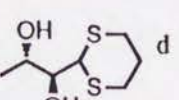
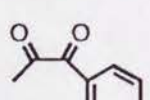
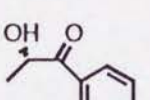
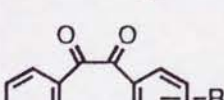
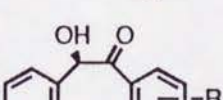
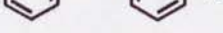
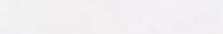
 <chem>O=C1C=CC2C(C1)C=CC2.Cr(CO)3</chem>	Bakers' Yeast	 <chem>O=C1C=CC2C(C1)C=CC2.Cr(CO)3.O</chem>	47	<i>S(endo)</i>	51	158
		 <chem>O=C1C=CC2C(C1)C=CC2.Cr(CO)3.O</chem>	5	<i>S(exo)</i>	71	158

表1-13 α -ジケトンの還元

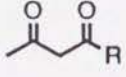
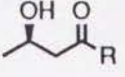

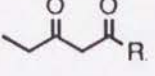
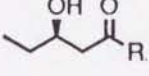
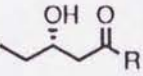
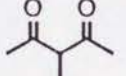
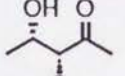
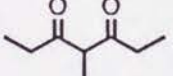
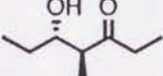
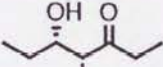
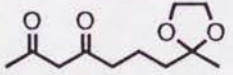
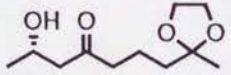
Substrate	Microbe	Product	Yield, %	e.e., %	Ref.
	Bakers' Yeast		71 ^a	92	201
			22 ^a		201
			7 ^a	99	201
	<i>Beauveria sulfurescens</i>		67 ^a	90	201
			100 ^a	99	201
	Bakers' Yeast		66	90 (72) ^b	202
	Bakers' Yeast		60	93	203
	Bakers' Yeast		82	97	203
	Bakers' Yeast		80	>95	204
	<i>Xanthomonas oryzae</i>	 R=H	86	>99	205
		 R=o-Me	60	94	
		 R=p-Me	54	99 (75) ^c	205,206

^a 光学純度, ^b d.e., ^c 2 時間反応, ^d 4 8 時間反応, ^e 主たるレジオ異性体の割合

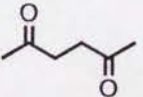
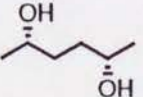
表1-14 β -および γ -ジケトンの還元

Substrate	Microbe	Product		Yield, %	e.e., %	Ref.
	Bakers' Yeast		R=Me	90 ^a	>99	207
				18	>99	208
	<i>Geotrichum candidum</i>			100 ^a	74	210
	<i>Mortierella isabellina</i>			—	99	214
	<i>Rhizopus arrhizus</i>			—	95	214
	<i>Candida utilis</i>			—	95	214
	<i>Rhodotorula rubra</i>			—	99	214
	Bakers' Yeast		R=Et	100 ^a	>99	207
				48	97	208
	<i>Dipodascopsis uninucleata</i>			—	90	214
	<i>Mortierella isabellina</i>			—	99	214
	<i>Mucor circinelloides</i>			—	99	214
	<i>Rhodotorula rubra</i>			—	96	214
	<i>Saccharomyces oviformis</i>			—	90	214
	Bakers' Yeast		R=Pr	62	94	208
			R=Bu	42	>99	208
			R=Pen	25	96	208
			R=Oct	23	97	208
			R= <i>i</i> -Pr	24	92	208
			R=	100 ^a	>99	207
				70	99	211
			R=Ph	21	94	208
				33	>98	209
				90 ^a	98 (70) ^b	210
<i>Aspergillus ochraceus</i>			R=Me	—	80	214
<i>Mucor circinelloides</i>				—	80	214
<i>Aspergillus niger</i>				75 ^a	95	210
<i>Aspergillus niger</i>			R=Et	100 ^a	99	210
			R=	75 ^a	95	210
			R=Ph	100 ^a	99	210

(表1-14 の続き)

	<i>Geotrichum candidum</i>		R=Et	100 ^a	99	210
			R= 	70	98	211
			R=Ph	100 ^a	90	210
	Bakers' Yeast		R=Et	100 ^a	30	207
	<i>Aspergillus niger</i>			100 ^a	95	210
	<i>Geotrichum candidum</i>			100 ^a	70	210
	Bakers' Yeast		R=Pr	100 ^a	98 (67) ^b	210
	<i>Aspergillus niger</i>			100 ^a	99 (100) ^b	210
	<i>Geotrichum candidum</i>			100 ^a	99 (65) ^b	210
	<i>Dipodascopsis uninucleata</i>			—	86 (100) ^b	214
	<i>Mucor circinelloides</i>			—	90 (80) ^b	214
	<i>Helminthosporium</i> sp.			—	90 (100) ^b	214
	Bakers' Yeast			30 ^a	95 (60) ^c	207
	<i>Aspergillus niger</i>			100 ^a	98 (80) ^c	210
	<i>Geotrichum candidum</i>			75 ^a	95 (12) ^c	210
	<i>Geotrichum candidum</i>		under O ₂	40	70	212
			under N ₂	70	100	212
	Bakers' Yeast			65	98	213

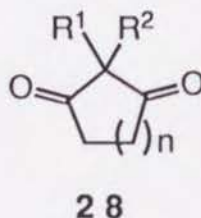
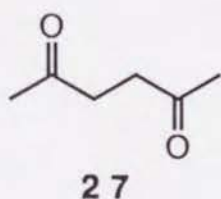
γ-Diketone

	Bakers' Yeast		50	>98	215
---	---------------	---	----	-----	-----

^a 光学純度, ^b 主たるレジオ異性体の割合, ^c d.e.

ールだけが選択的に得られている（表1-14）。

一方、環状の β -ジケトン**28**の還元は古くから知られており、微生物によるステロイドの変換反応が盛んに研究されていた時代にさかのぼる²¹⁶⁻²¹⁸。その後、1982年にBrooksら²¹⁹がこの反応の立体選択性について詳しく検討し、得られるケトールのキラルシントンとしての有用性を明らかにした(表1-15)。しかし彼らが初めに報告した絶対配置は間違っており、その後に彼らもその事を報告している^{220,221}。この反応はその後、多くの研究者によって詳しく検討され、五員環^{219,221,222}、六員環^{220,221,223-228}、七員環²²⁹、八員環²²⁹の β -ジケトンについて、立体選択的な還元が報告されている（表1-15）。



1.3.2.5 炭素-炭素二重結合の還元

三置換オレフィン**29**を還元すると光学活性な化合物が得られる。この反応はパン酵母のような微生物を用いても行う事ができ、種々のオレフィンの還元が報告されている（表1-16）。しかしこの反応は α, β -不飽和ケトン²³⁰⁻²³⁴のように、還元される二重結合の近傍に電子吸引性の置換基がある場合に限られている。その他の報告例としては、不飽和ニトロ化合物^{235,236}、不飽和エステル^{75,237-239}、不飽和アルデヒド²⁴⁰⁻²⁴³、共役二重結合²⁴⁴などの還元が報告されている。また、二置換オレフィン ($R^3=H$) の立体選択的還元反応も報告されている^{234,236}。

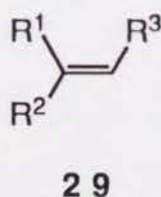
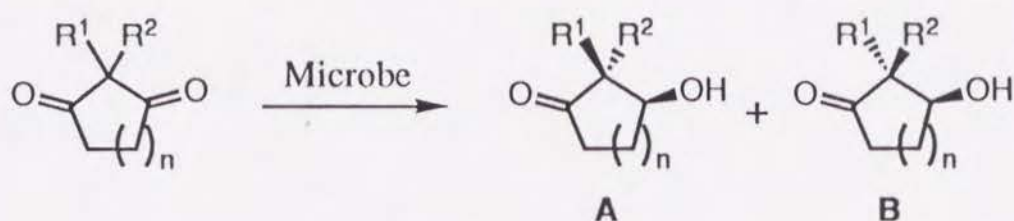
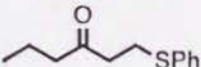
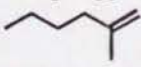


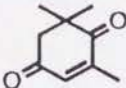
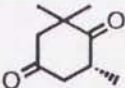







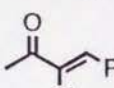
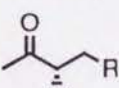
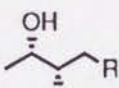
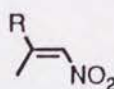
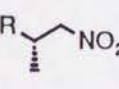
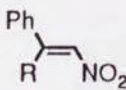
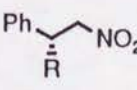
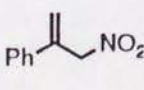
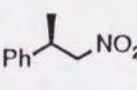
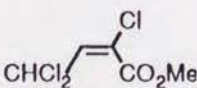
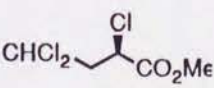
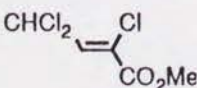
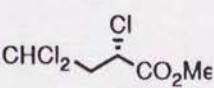
表1-15 環状のβ-ジケトンの還元



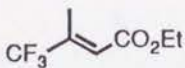
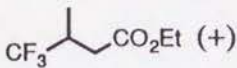
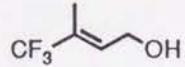
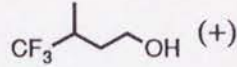
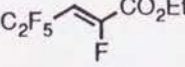
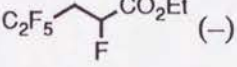
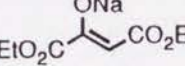
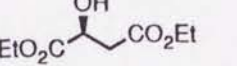
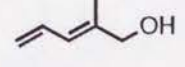
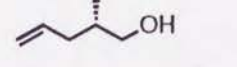
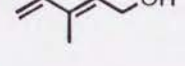
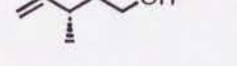
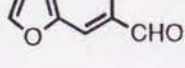
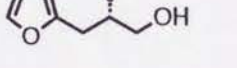
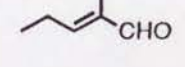
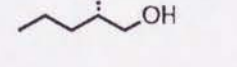
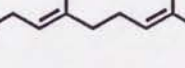
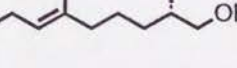
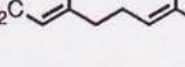
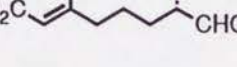
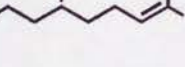
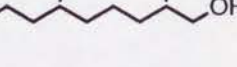
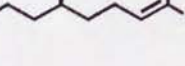
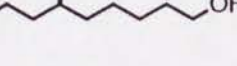

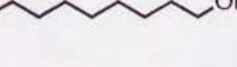


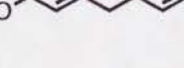
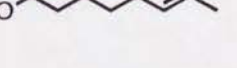
R ¹	Substrate R ²	n	Microbe	Product	Yield %	e.e. %	Ref.
Me	Pr	1	Bakers' Yeast	B	60	>98	219
Me	Allyl	1	Bakers' Yeast	A/B (9/91)	75	>98	219
Me	Propargyl	1	Bakers' Yeast	A/B (33/67)	60	>98	219
Me	CH ₂ CMe=CH ₂	1	Bakers' Yeast	B	75	>98	221
Me	(CH ₂) ₂ CN	1	Bakers' Yeast	A/B (4/96)	71	>98	221
Et		1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A	53	100	222
Me	Me	2	Bakers' Yeast		79	99	223,224
			Bakers' Yeast		67	94	225
			<i>Kloeckera magna</i>		66	>95	226
Me	Et	2	Bakers' Yeast	A/B (2.7/1)	51	99	227
			<i>Pichia terricola</i>	B	86	99	227
Me	Pr	2	Bakers' Yeast	A/B (78/22)	80	>98	220
Me	Allyl	2	Bakers' Yeast	A/B (55/45)	80	>98	220
Me	Propargyl	2	Bakers' Yeast	A/B (73/27)	75	>98	220
Me		2	Bakers' Yeast	A/B (76/24)	75	>98	220
Me	CH ₂ CMe=CH ₂	2	Bakers' Yeast	A/B (60/40)	49	>98	221
Me	(CH ₂) ₂ CN	2	Bakers' Yeast	A/B (70/30)	49	>98	221
(CH ₂) ₂ ^a	AcO(CH ₂) ₂	2	Bakers' Yeast	B	71	99	228
Me	Pr	3	Bakers' Yeast	A/B (98/2)	10	>98	229
Me	Allyl	3	Bakers' Yeast	B	60	>98	229
Me	Propargyl	3	Bakers' Yeast	A/B (29/71)	60	>98	229
Me	CH ₂ CMe=CH ₂	3	Bakers' Yeast	A/B (45/55)	40	>98	229
Me	Allyl	4	Bakers' Yeast	A/B (18/82)	5	>98	229

^a Bicyclo[2.2.2]octan-2,6-dione

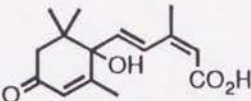
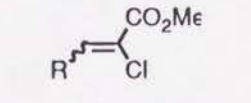
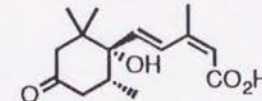
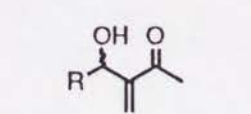
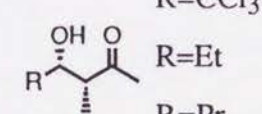
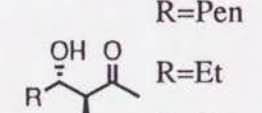
表1-16 炭素-炭素二重結合の還元

Substrate	Microbe	Product	Yield, %	e.e., %	Ref.
	Bakers' Yeast		83	100	230
	<i>Beauveria sulfrescens</i>		90	90	231
	<i>Beauveria sulfrescens</i>		30	92	231
			55	90	231
	<i>Beauveria sulfrescens</i>		80	90	231
	Bakers' Yeast		R=Et 19	44	232
			R=Pen 28	82	232
			R=Oct 47	84	232
			R=Et 50 ^a	>98	232
			R=Pen 61 ^b	>98	232
			R=Oct 22 ^c	>98	232
	Bakers' Yeast		R=Ph 50	98	235
			R=p-ClC ₆ H ₄ 48	89	235
			R=p-BrC ₆ H ₄ 57	94	235
			R=Hex 58	83	236
	Bakers' Yeast		R=Me 50	98	236
			R=Et 64	97	236
			R=Pr 23	89	236
	Bakers' Yeast		80	98	236
	Bakers' Yeast		65	92	237
	Bakers' Yeast		60	98	237

(表1-16 の続き)

	Bakers' Yeast	 (+)	68	76	75
	Bakers' Yeast	 (+)	61	67	75
	Bakers' Yeast	 (-)	72	78	75
	Bakers' Yeast		70	>98	238
	Bakers' Yeast		30	94	244
	Bakers' Yeast		25	97	244
	Bakers' Yeast		72	>99	240
	<i>Beauveria sulfrescens</i>		69	100	241
	Bakers' Yeast		20	>97	242
	Bakers' Yeast		35	>97	242
	Bakers' Yeast		30	>95	243
	Bakers' Yeast		35	>90	243
	Bakers' Yeast		35	>95	243
	Bakers' Yeast		44	>92	243
	Bakers' Yeast		25	>98	243

(表1-16 の続き)

	<i>Aspergillus niger</i>				33	>95	233
	Bakers' Yeast		R=Et(<i>E</i>)	<i>R</i>	23-28	47	239
			R=Et(<i>Z</i>)	<i>S</i>	23-25	>98	239
			R=Me ₂ CH(<i>E</i>)	<i>R</i>	6-10	68	239
			R=Me ₂ CH(<i>Z</i>)	<i>S</i>	32-40	>98	239
			R=Bu(<i>E</i>)	<i>R</i>	30-60	25	239
			R=Bu(<i>Z</i>)	<i>S</i>	32-40	>98	239
			R=CHCl ₂ (<i>E</i>)	<i>R</i>	54-65	92	239
			R=Bu(<i>Z</i>)	<i>S</i>	58-71	98	239
			R=CCl ₃ (<i>Z</i>)	<i>S</i>	41-69	>98	239
	Bakers' Yeast		R=Et		32	>98	234
			R=Pr		27	>98	234
			R=Bu		18	>98	234
			R=Pen		26	>98	234
			R=Et		29	>98	234
			R=Pr		37	72	234
			R=Bu		36	67	234
			R=Pen		46	69	234

^a 44% d.e., ^b 78% d.e., ^c 90% d.e.

1.3.2.6 アシロイン縮合

微生物によるフルフラールの還元反応を行なうと、アシロイン縮合型の生成物が得られる事をNeubergらが1921年に報告している²⁴⁵。この反応はその後、Fugantiら²⁴⁶⁻²⁵³が主に桂皮アルデヒドを基質に用いて、パン酵母による不斉アシロイン縮合（図1-7）の研究を精力的に行い、立体選択的な反応を報告している。また、得られた生成物をフェロモンや糖類の合成の中間体として役立てている²⁵⁴⁻²⁶²。

この縮合反応がパン酵母中のどの酵素によって行なわれているかはまだわかっていないが、最近Croutら²⁶³はこの反応がpyruvate decarboxylaseによって進行している可能性を強く示唆する結果を報告している。

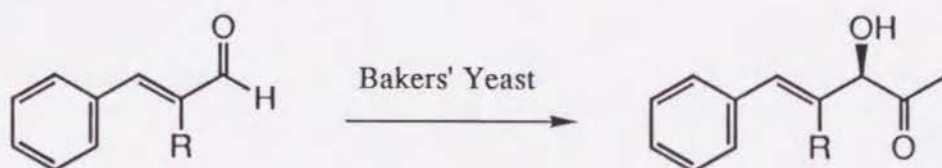


図1-7 パン酵母によるアシロイン縮合

1.3.3 還元反応における立体選択性の制御

微生物を用いた立体選択的還元反応は1.3.2で述べたように、様々な基質において達成され、少なくとも実験室レベルでは実用的な不斉合成法であると言える。しかしここに掲げた反応例は成功した例ばかりであり、全ての基質に対してうまく行くわけではない。むしろうまく行かない場合の方が多い。また、成功している場合でも逆の立体配置を持つ化合物を得る事は難しい。化学的不斉合成ならば、R体の不斉源を用いて一方の鏡像体のみを合成できるなら、S体の不斉源を用いる事によってもう一方の鏡像体を得る事が可能な場合が多い。生体触媒ではこのような作り分けが最も難しい。このような欠点を克服し、生体触媒をより有用な不斉合成試薬とするためには立体選択性の制御方法の開発が必要である。

微生物を生体触媒として用いる場合に、不斉収率が悪い理由には次の可能性が考えられる。

1. 還元は一種類の酵素で進行しているが、酵素と基質が不適合であるために、酵素反応自身の選択性が悪い場合。
2. 還元が複数の酵素で進行し、それぞれの酵素反応は高い不斉収率で進行しているが、相反するエナンチオマーを与える酵素が存在するため、結果として不斉収率が悪い場合。
3. 還元が複数の酵素で進行し、それぞれの酵素反応自身の不斉収率も悪い場合。

いずれの場合にせよ反応で変えられるものは、触媒か基質か反応の環境しかないので、立体選択性の制御法はこの三つにしばられる。即ち、微生物のスクリーニングと基質の修飾、そして反応条件の検討である。以下、これまでに報告されてきた立体選択性の制御法をこの三種類に分けて詳しく述べる。

1.3.3.1 微生物のスクリーニングによる方法

微生物にはかび、酵母、細菌、ウイルスなど様々な種類がある。そして、それぞれが生体触媒としても異なった働きをしてくれるので、目的とする反応が行える微生物を見つけ出せば非常に有効な方法である。しかしこの方法は有機化学の研究室では困難であり、多くの保存菌体を所有している農学系の研究室や企業において有効な方法である。

アセト酢酸エチル**12**をパン酵母で還元すると90%程度の不斉収率でS体のヒドロキシエステルが得られる。Wipfら⁴⁹はこれを*Geotrichum candidum*で行いR体を90% e.e.で得ている(図1-8)。また、Ghiringhelliら¹¹²はこの基質で同じ種類の菌である*Geotrichum candidum*から変異株を使い分けて両方の鏡像体を得ている(図1-9)。3-オキソペンタン酸エステルをパン酵母で還元すると40~55%程度の不斉収率でR体 that 得られる^{66,115}。Seebachら¹¹⁴はエチルエステルを*Thermoanaerobium brockii*で還元しS体を93% e.e.で得、牛尾ら¹¹⁵はメチルエステルを、メタノールを炭素源として培養した*Hansenula polymorpha*で還元しR体を99% e.e.で得ている(図1-10)。Croutら⁸⁵は γ 位を硫黄官能基で置換した β -ケトエステルの還元で微生物をスクリーニングし、*Saccharomyces cerevisiae*でR体、*Candida guilliermondii*でS体のヒドロキシエ

ステルを作り分けている。同様に森ら⁸⁸は δ 位を硫黄官能基で置換した β -ケトエステルで、*R*体と*S*体を作り分けている（図1-11）。

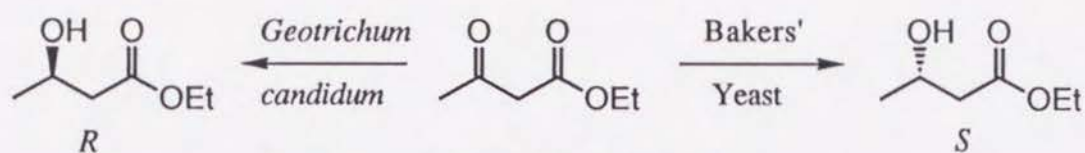


図1-8 アセト酢酸エチルの還元

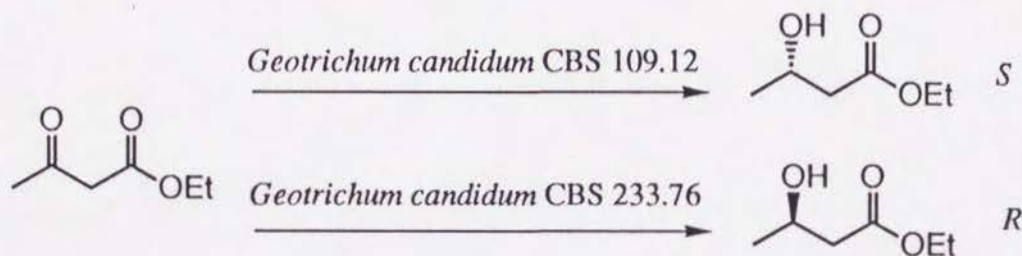


図1-9 *Geotrichum candidum*によるアセト酢酸エチルの還元

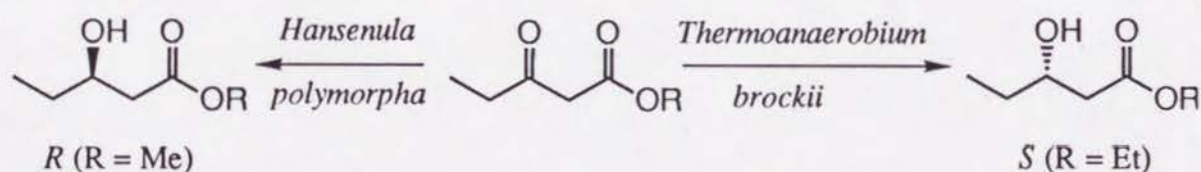


図1-10 3-オキソペンタン酸エステルの還元

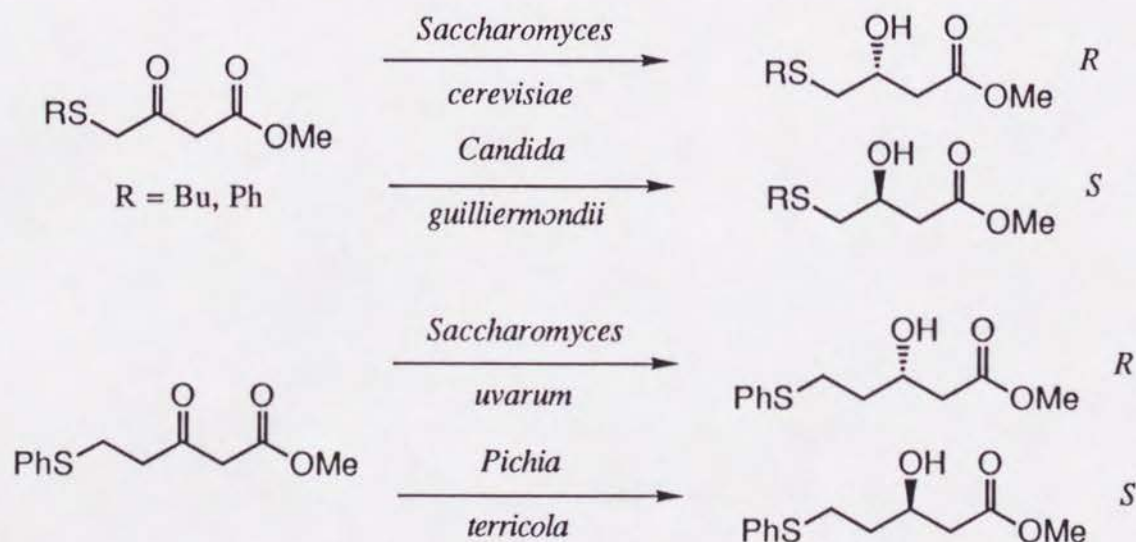


図1-11 硫黄官能基を有する β -ケトエステルの還元

α -アルキル- β -ケトエステル**16**をパン酵母で還元すると1.3.2.1で述べたようにシン体とアンチ体の混合物が得られる。中村ら¹²¹は*Mucor javanicus*の培養条件を検討し、シン体を選択的に合成している。また、Azeradら⁹⁷は*Geotrichum candidum*や*Rhizopus arrhizus*を用いてアンチ体を選択的に得ている(図1-12)。大石ら¹³²⁻¹³⁶は40種類の微生物をスクリーニングし、2-メチル-3-(2'-フリル)-3-オキソプロピオン酸メチルの選択的な還元を報告している(図1-13)。 γ 位をベンジルオキシ基で置換した α -メチルアセト酢酸エチルについても、Azeradら¹²⁹が*Geotrichum candidum*を用いアンチ体を選択的に合成している(図1-14)。

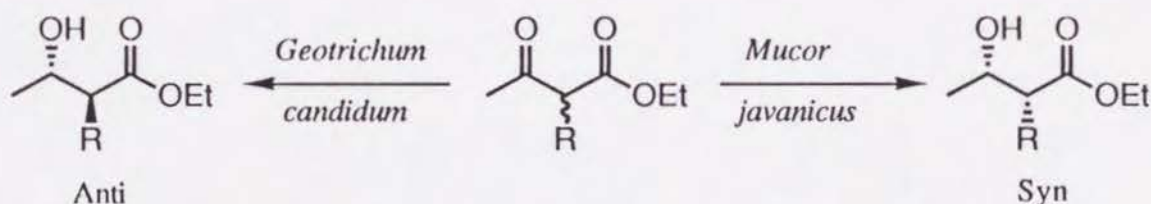


図1-12 α -アルキル- β -ケトエステルの不斉還元

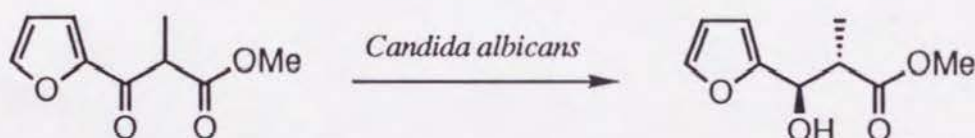


図1-13 2-メチル-3-(2'-フリル)-3-オキソプロピオン酸メチルの還元

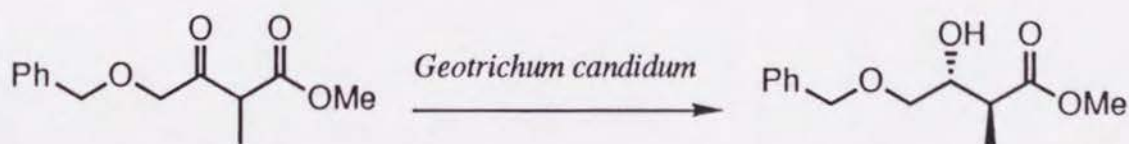


図1-14 4-ベンジルオキシ-2-メチル-3-オキソブタン酸メチルの還元

環状の β -ケトエステル**18**をパン酵母で還元するとシス体(シン体)のヒドロキシエステルが選択的に得られる。Azeradら¹⁰³は*Rhizopus arrhizus*や*Colletotrichum gloeosporoides*を用いトランス体(アンチ体)を選択的に合成している(図1-15)。また、清水ら²⁶⁴はケトパントイルラクトンの還元について、191種類の微生物をスクリーニングし、D-(-)-体とL-(+)-体のパントイル

ラクトンを作り分けている（図1-16）。

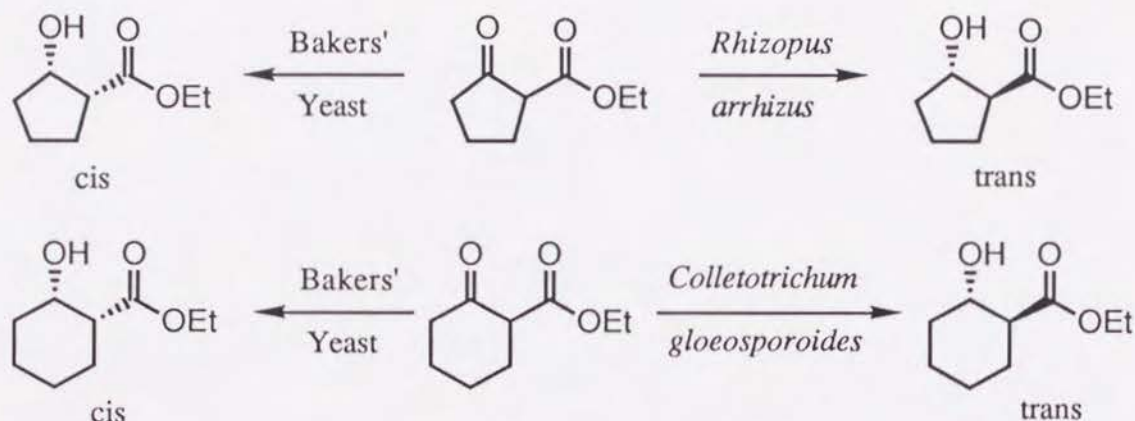


図1-15 環状の β -ケトエステルの還元

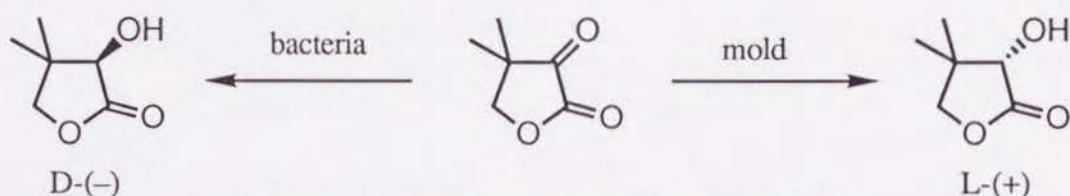


図1-16 ケトパントイルラクTONの還元

α -ホルミルエステル**17**のパン酵母還元は立体選択性が良くない事が Seebachら⁹⁹によって報告されている。Matzingerら¹⁰¹は107種の微生物のスクリーニングを行い、種々の α -ホルミルエステルで選択的にR体のヒドロキシエステルを得る事に成功している。

アセトフェノンのパン酵母還元ではS体のフェネチルアルコールが得られるが、不斉収率は低い⁴³。Zifferら¹⁵⁵は*Cryptococcus macerans*で還元し選択的にS体のフェネチルアルコールを得ている。

6-メチル-5-ヘプテン-2-オンを還元すると、フェロモンであるスルカトールが得られる。Veschambreら¹⁶⁶はパン酵母や*Thermoanaerobium brockii*でS体を合成し、*Aspergillus niger*でR体を得ている(図1-17)。Ghiringhelliら^{177,178}はジチアニルアセトンの還元で、パン酵母でS体を*Streptomyces* sp.でR体をそれぞれ作り分けている(図1-18)。また、Veschambreら²¹⁰は種々の β -ジケトン**26**の還元における選択性的変化を検討し、パン酵母でS体を*Aspergillus*

*niger*や *Geotrichum candidum* で R 体を合成している (図1-19)。

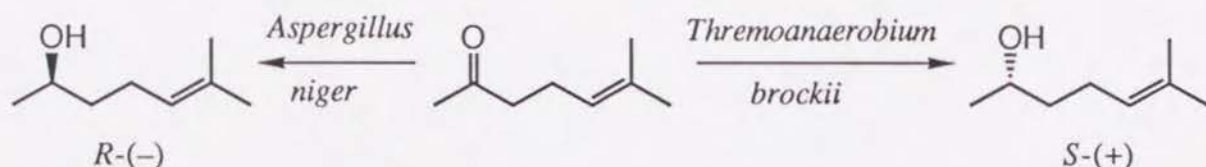


図1-17 スルカトールの合成

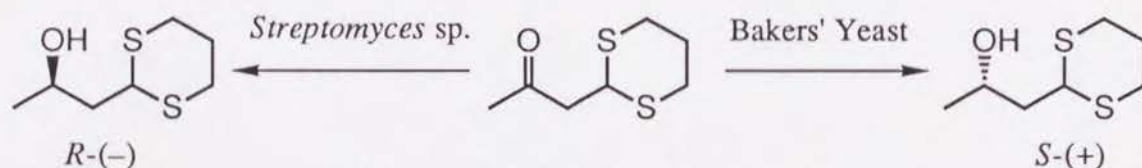


図1-18 ジチアニルアセトンの還元

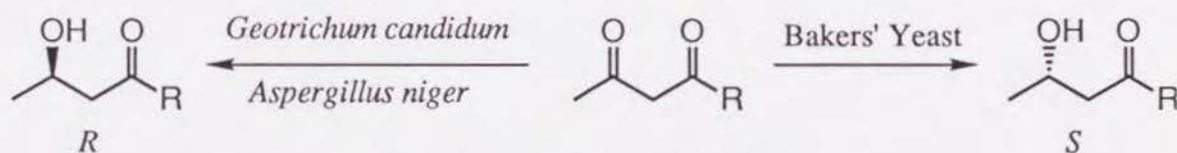


図1-19 種々の β -ジケトンの還元

以上、種々の微生物のスクリーニングによる立体選択性の制御についてまとめてみた。一般的に、パン酵母や *Thermoanaerobium brockii* に対して *Aspergillus niger* や *Geotrichum candidum* が逆の選択性を示すという傾向がみられるようである。しかし、Ghiringhelliら¹¹²の報告では同じ種類の菌体から両方の鏡像体を得られる事もあり、微生物のスクリーニングに関しては規則性はほとんど無いと言える。とにかくやってみなければ解らないというのがこの方法の現状である。

1.3.3.2 基質の修飾による方法

Prelogは⁴²カルボニル基の置換基に大小関係がある場合、アルコールデヒドロゲナーゼの補酵素からのヒドリドの攻撃はRe面から起こり、S体のアルコールが生成するという規則性があることを報告している (図1-20)。これを一般的にPrelog則という。基質の修飾による立体選択性の制御はこのPrelog則を手がかりに行っている場合が多い。

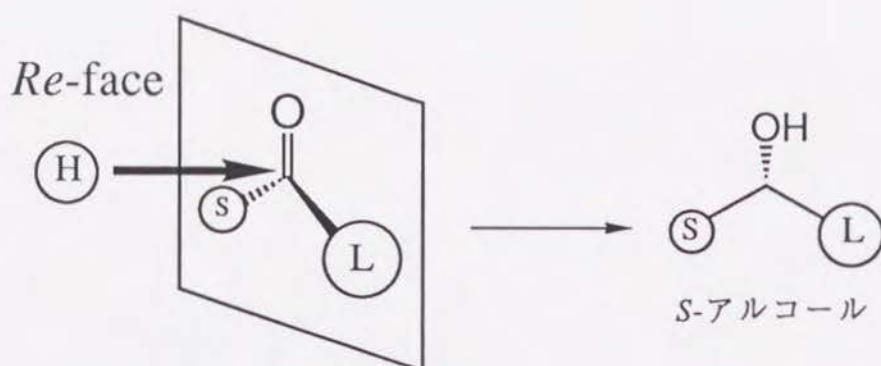


図1-20 Prelog則

ケトエステルの場合エステルのかさ高さを変える事で、置換基の大小を制御できる。Sihra⁷³は γ -クロロアセト酢酸のエチルエステルをパン酵母で還元するとS体のヒドロキシエステルが55% e.e. で得られるが、これをオクチルエステルにする事によってR体のヒドロキシエステルが97% e.e. で得られる事を報告している。これとは逆に平間ら⁹¹は、パン酵母還元で不斉収率が悪い3-オキソ-6-ヘキセン酸のエステルを加水分解し遊離のカルボン酸として反応させると、99%以上の不斉収率でR体のヒドロキシ酸が得られる事を報告している（図1-21）。この様にエステルのかさ高さを変えるという方法は、以後選択性を制御する一般的な方法としてよく用いられるようになった。

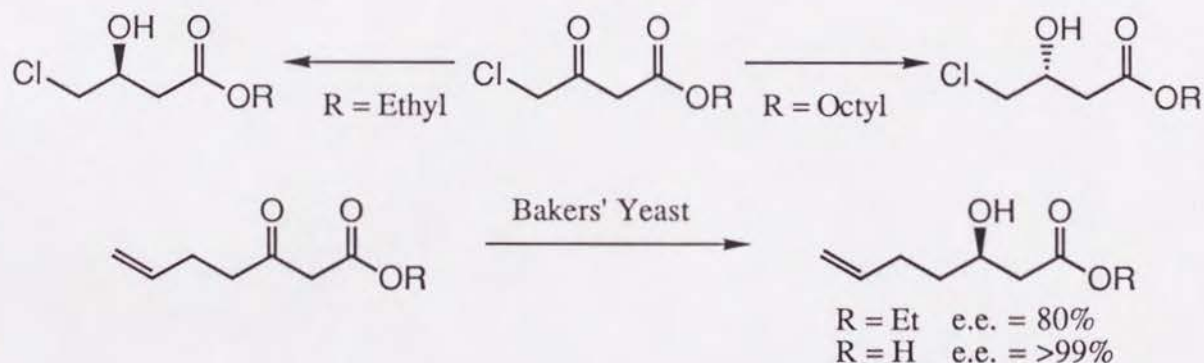


図1-21 エステルのかさ高さによる立体選択性の制御

また、中村ら^{95,96}は α -アルキル- β -ケトエステルの還元におけるジアステレオ選択性に、エステルの形が大きく影響する事を報告している（図1-22）。即ち、同じ様にかさ高い置換基でも、ネオペンチルエステルはシン体を選択

的に与えるのに対し、*t*-ブチルエステルはアンチ体を選択的に与えている。この反応はその後の研究²⁶⁵によって酵素レベルでの詳細な反応機構の検討がなされている。

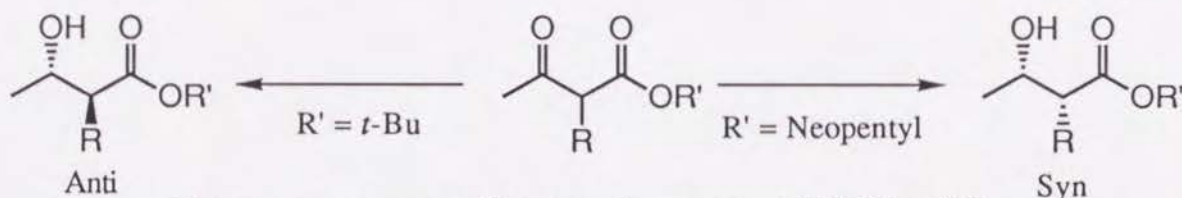


図1-22 エステルの形によるジアステレオ選択性の制御

Seebachら⁷⁹は γ 位に水酸基を有する β -ヒドロキシエステルを選択的に得るために、 γ 位を*t*-ブトキシ基で置換した β -ケトエステルを還元し*R*体のジヒドロキシエステルを得ている。

硫黄官能基は脱硫等の化学的変換で除去する事が容易なので、置換基に硫黄官能基を導入した例も多い。中村ら⁸⁴はアセト酢酸エチルの γ 位にフェニルスルホニル基を導入し、パン酵母で還元した後脱スルホニル化する事によって逆の立体配置を持つ*R*体のヒドロキシエステルを合成している(図1-23)。また、この方法はアセトフェノンの還元⁸⁴にも応用されている。藤沢ら¹²⁶は α 位にメチルチオ基を導入した β -ケトエステルを還元する事によって、 β 位の立体選択性を向上させている。生成物はスルホキシドに変換した後還元的に脱離する事によって(*S*)- β -ヒドロキシエステルに変換できる(図1-24)。

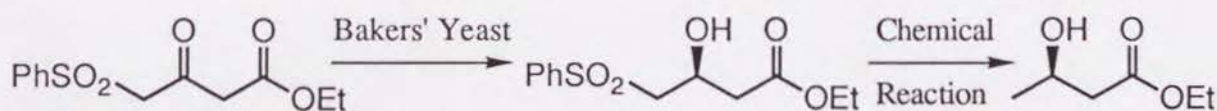


図1-23 硫黄官能基の導入による立体選択性の制御-1

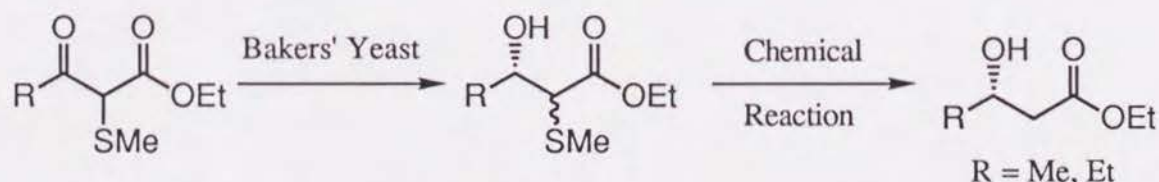


図1-24 硫黄官能基の導入による立体選択性の制御-2

α -アルキル- β -ケトエステルの還元反応のジアステレオ選択性を向上させるために、藤沢ら⁹⁰はエステルをジチオエステルに置き換えて検討している。 α -メチルアセト酢酸ジチオエステルではシン体を選択的に得られ、シクロヘキサノンジチオカルボキシレートではシス体のみが得られる。このような高いシン選択性はエステルよりもジチオエステルの方がエノール化しやすいためと考えられている(図1-25)。ジチオエステルは酸化銅(II)と塩化銅(II)の存在下アルコールで処理するとエステルに変換できる。

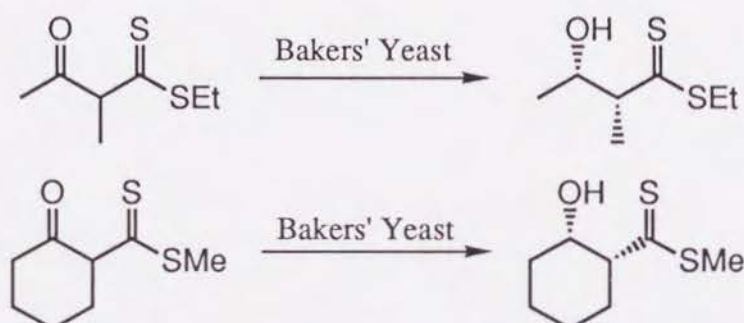


図1-25 硫黄官能基の導入による立体選択性の制御-3

また、Hoffmannら^{140,141}は選択性が良い環状の β -ケトエステルに硫黄原子を導入し、これを還元した後脱硫する事によって光学活性なヒドロキシエステルを得るという方法を開発している(図1-26)。

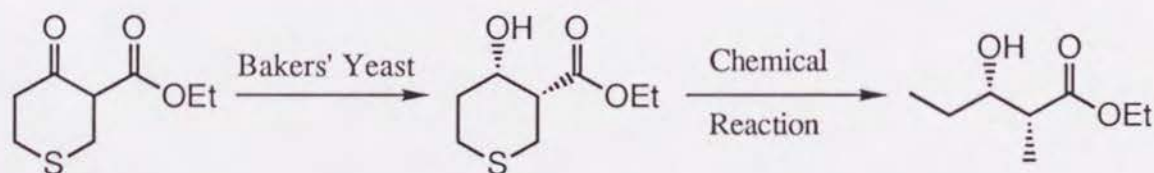


図1-26 硫黄官能基の導入による立体選択性の制御-4

α 位に水酸基を有する β -ケトエステルの還元は、ジアステレオ選択性もエナンチオ選択性も悪い¹²⁴。宇高ら¹²⁵は水酸基を安息香酸エステルに変換する事によって、生成物として(2R,3S)体のみが得られる事を報告している。また、ヒドロキシアセトフェノン場合は水酸基をエステルにすると逆の立体配置

のジオールが得られる¹⁵⁹ (図1-27)。

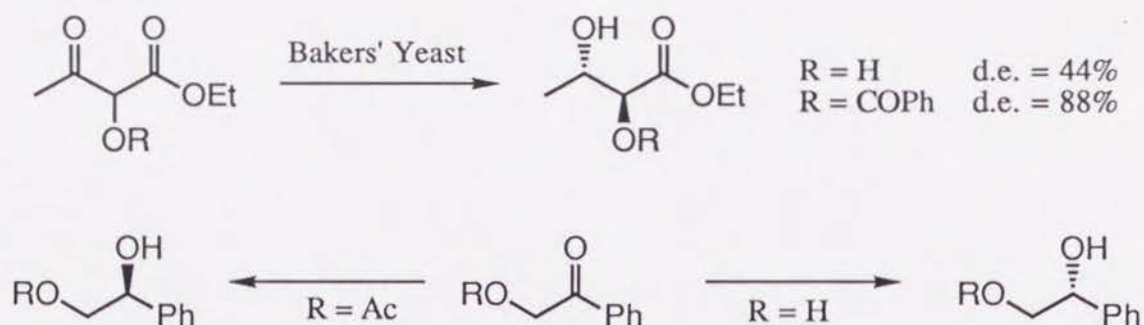


図1-27 水酸基のエステル化による立体選択性の制御

アセトフェノンの還元ではフェニル基のかさ高さを変えるために、中村ら⁸⁴はパラ位をヨウ素で置換したアセトフェノンを、また、Jaouenら¹⁵⁸はフェニル基をクロムのトリカルボニル錯体としたアセトフェノンを用いて還元した後、余分な部分を脱離する事によって、それぞれ選択的に*S*体のフェニルエタノールを得ている (図1-28)。

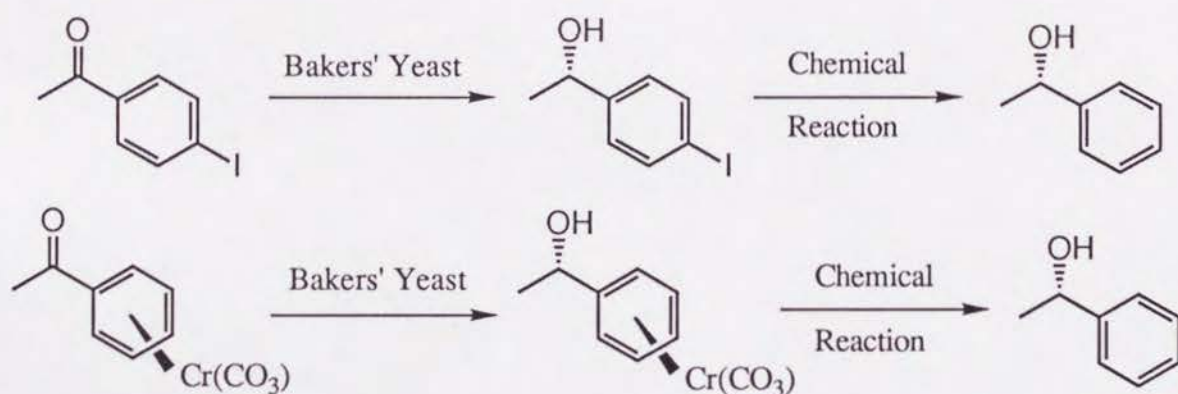


図1-28 (*S*)-フェニルエタールの立体選択的合成

また中村ら⁸⁴は、アセトフェノンのメチル基にかさ高い置換基であるフェニルスルホニル基を導入し還元した後、余分な部分を脱離する事によって、逆の立体配置を有するフェニルエタノールを得ている (図1-29)。

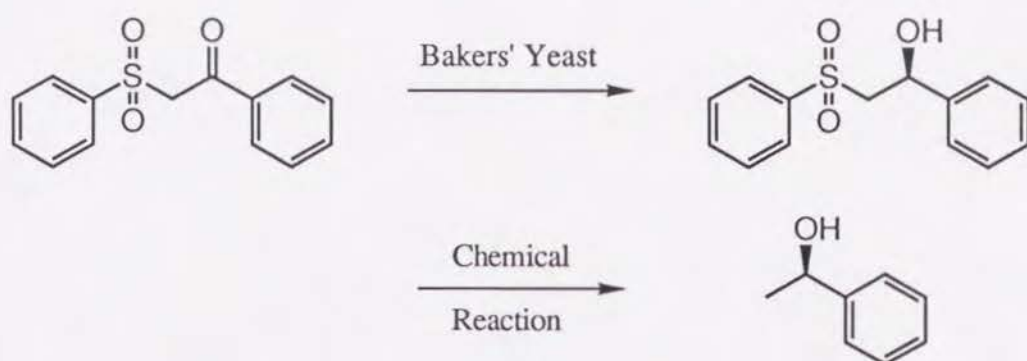


図1-29 (R)-フェニルエタノールの立体選択的合成

以上の様に、基質の修飾による立体選択性の制御は、Prelog則を手がかりにして選択性の向上という意味では成功を収めていると言える。しかし両鏡像体の作り分けに関して成功している例は少ない。これは、基質の構造を大きく変えなければならず、酵素の基質特異性によって反応性が大きく変化してしまうためと考えられる。

1.3.3.3 反応条件の検討による方法

微生物による還元反応で、複数の酵素が関与しそれぞれが相反する鏡像体を与えるために反応の立体選択性が悪い場合、反応条件を変化させるだけで立体選択性が制御できる可能性がある。つまり反応条件の違いがそれぞれの酵素活性に影響を及ぼし、結果として立体選択性に変化が現れるという方法である。方法としては反応条件（基質濃度やpH）の変化、微生物の固定化、有機溶媒の使用、そして阻害剤や活性化剤の使用等が考えられる。

Wipfら⁴⁹はアセト酢酸エチルの還元では、基質濃度が低い程得られるヒドロキシエステルの立体選択性は良くなると報告している（図1-30）。またFugantiら⁷⁷は γ -プロモアセト酢酸エチルを還元する際にpHを6.0から8.0にすると、得られる(S)-ヒドロキシエステルのe.e.が70%から100%にまで向上すると報告している。Santanielloら⁸⁰は γ -ベンゾイルアセト酢酸エチルの還元では、基質に対するパン酵母の割合を多くしていくと不斉収率が向上すると報告している。

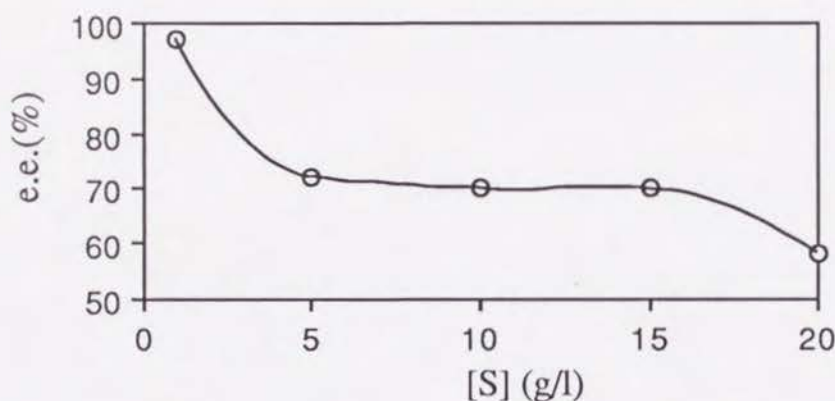


図1-30 基質濃度による不斉収率の変化

一方、Veschambreら²¹²は反応を酸素雰囲気下で行なった場合と窒素雰囲気下で行なった場合で、 β -ジケトンの還元のアステレオ選択性が逆になると報告している。これは窒素雰囲気下では酸化的な代謝経路が阻害されているためであると考えられている (図1-31)。

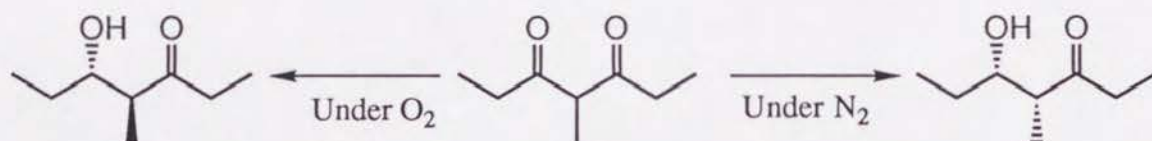


図1-31 反応条件によるジアステレオ選択性の制御

固定化による方法では、中村ら⁵⁵がポリウレタンでパン酵母を固定化すると、種々の β -ケトエステルの還元でD体のヒドロキシエステルが得られると報告している (図1-32)。また、宇高ら¹²⁵は2-アセトキシアセト酢酸エチルの還元で、パン酵母をアルギン酸カルシウムで固定化すると反応のアンチ選択性が向上するとしている。

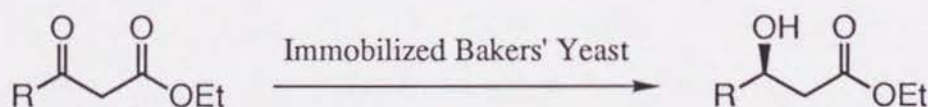


図1-32 固定化パン酵母による β -ケトエステルの還元

酸化還元酵素が有機溶媒に対して不安定なため、パン酵母を有機溶媒中で反応させた例は少ない。中村ら^{104,105}はパン酵母をポリウレタンで固定化する事によってヘキサン中で反応が行えることを見だし、種々の α -ケトエステルではR体の選択性が向上する事を報告している（図1-33）。しかし、直島ら^{51,52}はパン酵母をアルギン酸カルシウムで固定化しヘキサン中で反応を行ったが、この場合、立体選択性に変化は見られなかった。

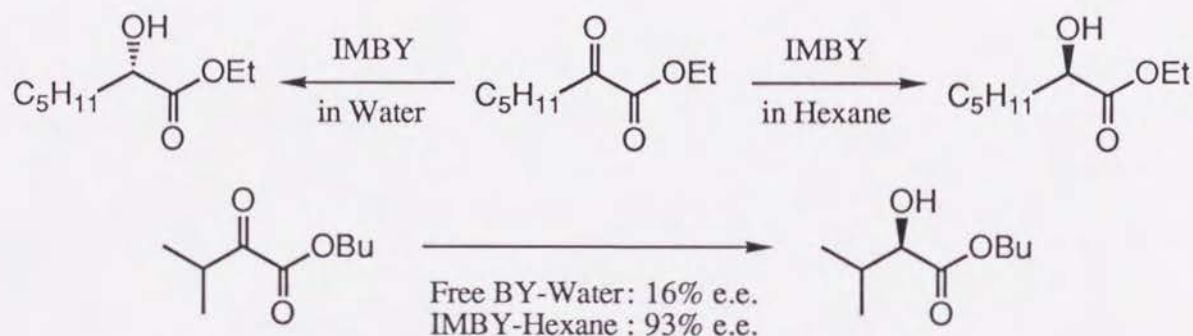


図1-33 有機溶媒による立体選択性の制御

Lanzilottaら²⁶⁶は環状のジケトンの還元で反応系にアリルアルコールを加えると、反応速度と選択性が向上する事を報告している（図1-34）。一方、中村ら⁵⁴は阻害剤としてアリルアルコールを用い、 β -ケトエステルの還元でD体を選択的に得ている（図1-34）。

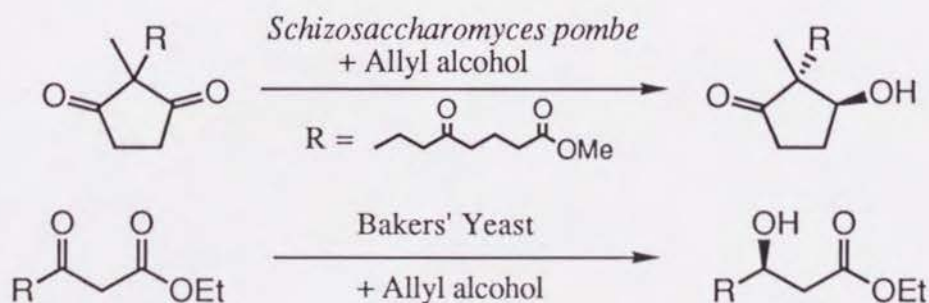


図1-34 添加剤による立体選択性の制御

反応条件を変えることによって立体選択性を制御しようという試みは、ま

だまだ報告例が少ない。しかし、R酵素とS酵素が反応に関与しているために不斉収率が悪い場合に、これらの酵素の活性を自由に制御することが出来れば、パン酵母だけで、基質を変えることなく両鏡像体を作り分けられるので、有用な不斉合成法となる。

1.3.4 その他の生体触媒による反応

1.3.4.1 酵素による還元

数十種類の脱水素酵素が精製され市販されていて、有機合成の触媒として用いられている。精製された酵素を用いるために、副反応がなく立体選択性が高いという長所があるが、一般的には次のような欠点があり微生物ほどには用いられていないのが現状である。

1. 基質特異性が強く目的とする化合物を変換してくれない場合がある。
2. 室温では不安定な酵素が多く、失活してしまう。
3. 補酵素の再生が必要である。
4. 酵素も補酵素も高価である。

酵素による還元では馬肝臓由来のアルコール脱水素酵素(HLADH)が最も盛んに研究されている。この酵素についてはPrelogら⁴²のダイヤモンド格子モデルや、Jonesら²⁶⁷のCubic-Space Sectionモデル等の活性中心のモデルが提唱されており、立体選択性についての詳細な研究がなされている。また、立体選択的な還元反応については、Jonesら²⁶⁷⁻²⁷⁴が精力的に研究を行っている。

乳酸脱水素酵素(LDH)を用いた不斉還元は、Whitesidesや^{275,276}Kimら²⁷⁷によって報告され、種々の α -ケト酸を還元してD体とL体の α -ヒドロキシ酸が選択的に得られている。

耐熱性の菌である*Thermoanaerobium brockii*由来の脱水素酵素(TBADH)は熱的に安定な酵素であり、これを用いてKeinanら^{278,279}が立体選択的な還元を報告している。また、Wongら²⁸⁰やDe Amiciら²⁸¹もアセチルフランやアセチルイソオキサゾールを還元して光学活性なアルコールを得ている。

その他には、*Pseudomonas* sp.由来のアルコール脱水素酵素(PADH)²⁸²やグリセロール脱水素酵素(GDH)^{283,284}による還元が報告されている。

酵素を不斉合成の触媒として役立てようとする場合、熱的な安定性が一番問題となる。耐熱性菌由来の脱水素酵素を用いるなどの方法が開発されては

いるが、ほとんどの還元酵素は熱的に不安定であるので、固定化を初めとする酵素の安定化に関する研究が今後望まれる。また、酵素による還元反応はほとんどが水中での反応である。これを有機溶媒中で行なう事ができれば、応用範囲が広がり、より有効な不斉合成法と成りうる。今後の研究に期待したい。

1.3.4.2 酸化反応

微生物や酵素による酸化反応には $\text{CH-OH} \rightarrow \text{C=O}$ 、 $\text{C-H} \rightarrow \text{C-OH}$ 、 $\text{S} \rightarrow \text{S-O}$ 等の変換が知られている。微生物を用いる場合は、反応が呼吸鎖の中の一連の酸化酵素によって行われている場合が多く、基質がエネルギー源として代謝分解されてしまわないような工夫が必要である。

アルコールの酸化反応ではJonesら²⁸⁵⁻²⁹¹が馬肝臓アルコール脱水素酵素(HLADH)を用い、メソジオールを酸化して光学活性なラクトンを得ている。また、C-H結合の酸化反応では長谷川ら²⁹²⁻²⁹⁶が微生物による脂肪酸の β -水酸化反応で種々の光学活性な β -ヒドロキシ酸を合成している。スルフィドの酸化では太田ら²⁹⁷⁻³⁰³が微生物を用いて光学活性なスルホキシドやスルホンを合成している。その他のスルフィドの生体触媒による酸化反応についてはHollandの³⁰⁴総説に詳しく述べられている。二重結合の酸化反応ではGibsonら³⁰⁵⁻³¹²が*Pseudomonas putida*による芳香族化合物の水酸化で種々のジオールを得ている。Taylorら^{313,314}も同様に*Pseudomonas putida*を用いて芳香族化合物の水酸化反応を報告している。古橋ら³¹⁵⁻³¹⁷や太田ら^{318,319}は微生物を用いる事によって、Sharpless酸化の様な化学的酸化反応では不活性なオレフィンを不斉エポキシ化し、光学活性なエポキシドを得ている。また、Furstossら^{320,321}は*Aspergillus niger*を用いてオレフィンを酸化し、光学活性なジオールを合成している。

このように、生体触媒とくに微生物を用いた酸化反応は、化学的には変換が困難な官能基しか持たない基質の、立体特異的あるいは位置特異的な水酸化やエポキシ化を行う事ができ、光学活性な合成中間体の合成に非常に有効な方法である。

1.3.4.3 光学分割

加水分解酵素は安価に市販されており、容易に手に入る事、補酵素を必要とせず酵素が比較的安定な事から、これを生体触媒として用いた光学分割による不斉合成が盛んに研究されている。とくにKlibanovら³²²⁻³²⁷がこの酵素反応が有機溶媒中で行える事を示して以来、エステル化やエステル交換反応も可能になり、ばく大な量の光学分割の反応例が現在報告されている。エステル化やエステル交換反応は可逆反応であるため逆反応が起きてしまうという不都合があったが、最近ではエノールエステルをアシル供与体とする事によって反応が不可逆になり、効率的な反応が開発され報告されている³²⁸⁻³³³。

加水分解酵素による光学分割は、酸部に不斉がある場合とエステル部に不斉がある場合の二種類に分けられる。カルボン酸の光学分割では非天然型アミノ酸や^{334,335}、エポキシエステル³³⁶⁻³³⁸、ヒドロキシエステル³³⁹等に応用した例がある。これらラセミ体の光学分割では100%キラルな化合物は最高で50%の収率でしか得られないという欠点がある。しかしメソ体やプロキラルな化合物の場合は、光学分割すると理想的には100%e.e.の化合物が100%の収率で得られる事から、これらの化合物の反応例³⁴⁰⁻³⁴⁵も多数報告されている。

また、ラセミ体のアルコールの光学分割では、有機溶媒中でのエノールエステルによるエステル化が最も多く報告されている。基質としては脂肪族アルコール^{346,347}、エポキシアルコール³⁴⁶、ニトロアルコール³⁴⁸、ヒドロキシエステル^{347,349}、芳香族アルコール³⁵⁰、環状アルコール³⁵¹⁻³⁵³等、様々なアルコールが光学分割されている。アルコールの光学分割の場合でも先程と同様な理由で、メソ体やプロキラルな化合物の光学分割^{346,354-361}が多数報告されている。また最近では、プロキラルなエノールエステルの加水分解によってキラルなケトンを得たという興味深い報告³⁶²⁻³⁶⁵もある。その他の基質としては糖の選択的アシル化³⁴⁶や加水分解³⁶⁶、核酸塩基の選択的アシル化³⁶⁷や加水分解³⁶⁸、そしてヒドロペルオキシドのアシル化³⁶⁹、有機金属錯体のリパーゼによる分割^{346,370-372}といった不安定な化合物の光学分割まで報告されている。

加水分解酵素を用いたラセミ体の光学分割は、反応が有機溶媒中で行えるという発見以来急速に発展し、非常に数多くの反応例が報告されている。現在生体触媒による不斉合成のなかでも最も活発に研究されている分野である。

以上述べてきたように、生体触媒を用いた不斉合成反応はこの十数年の間に急速な進歩を見せ、少なくとも実験室レベルでは実用的な不斉合成法であると言える様になった。しかし、まだまだ検討しなければならない課題が山積みされている。本研究は、「生体触媒を用いた場合にも、必要とする立体配置の化合物を高い不斉収率で得ることは出来ないだろうか？」という疑問に端を発している。即ち、生体触媒を用いた場合に難しいとされている光学異性体の作り分けに関する研究を行い、その結果をまとめたものである。

第2章 パン酵母による不斉還元の立体選択性に及ぼす添加剤の効果

2.1 序論

光学活性な β -ヒドロキシエステルはフェロモン^{46,47,56-61}や抗生物質⁶²⁻⁶⁴等の生理活性物質の重要な合成中間体として、多くの研究者に利用されている。合成方法としてはアルドール縮合による方法とケトエステルの還元による方法がある。アルドール縮合による方法は1.2で詳しく述べたが、キラルなアルデヒドを用いる方法^{18,19}、キラルなエノラートを用いる方法²⁰⁻²³、キラルなプロモーターを用いる方法²⁴など多数の反応が報告されている。これらは全て不斉源を化学量論的に用いなくてはならない反応で、触媒的な不斉反応の報告は殆ど無い。それに対してケトエステルの還元による方法では多くの触媒的な不斉反応が報告されている。化学的な還元では野依ら^{10,373,374}がBINAP-Ru錯体を用いて選択的な不斉水素化に成功している。また、生体触媒による還元では1.3.2.1に詳しく述べたように、種々の β -ケトエステルがパン酵母によって還元され光学活性な β -ヒドロキシエステルに変換されている。

パン酵母は唯一市販されている微生物であり安価で容易に入手できることから、還元反応を行う場合に最も多く用いられている生体触媒である。しかしエチルエステルのような単純な β -ケトエステルの還元は、表1-1に示したように何れの場合も不斉収率が良くない。そこで1.3.3で述べたように、エステルの大きさを変えたり、微生物をスクリーニングしたりして高い不斉収率でヒドロキシエステルを得るという試みがなされてきた。

パン酵母による β -ケトエステルの還元の不斉収率が良くない理由は、Shiehら³⁷⁵によって解明されている。彼らはパン酵母中から4-クロロ-3-オキソブタン酸エステルを還元する酵素を三種類単離し、D体を生成する酵素(D-Enzyme)が二種類とL体を生成する酵素(L-Enzyme)が一種類あることを明らかにした(図2-1)。つまり、各々の酵素反応自身は立体選択的に進行しているが、両方のエナンチオマーを与える酵素が競争して作用しているために不斉収率が良くないのである。このような場合、ある特定の酵素反応を阻害したり活性化したりする事ができれば反応の立体選択性を向上させる事ができるはずである。そればかりか両方の立体配置の生成物を与える酵素が存在する事が

ら、それぞれの酵素を選択的に阻害する事ができれば両方の光学異性体の作り分けも可能である。

この様な観点からこの章では、種々の添加剤を用いてパン酵母による β -ケトエステルの還元の立体選択性に及ぼす影響を調べ、立体選択的な反応の開発と両光学異性体の作り分けについて検討した。

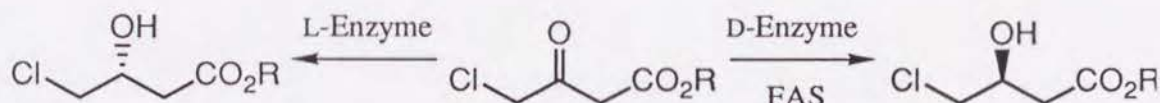


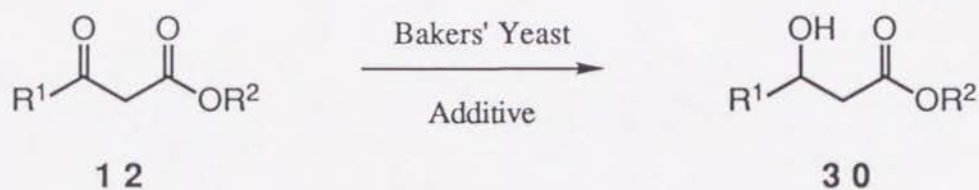
図2-1 パン酵母による β -ケトエステルの還元反応機構

2.2 本論

2.2.1 α , β -不飽和ケトンの添加

パン酵母還元の立体選択性に及ぼす添加剤の効果を評価する場合、添加剤をなにも加えていない場合の不斉収率が悪い方がむしろ好ましいと考えられる。それは、不斉収率が悪い場合にはR体とS体を生成する酵素が同程度に作用しているので、添加剤がどちらの酵素に強く影響しているかが評価し易いためである。種々の β -ケトエステルのパン酵母による還元の研究を調べたところ、3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) のパン酵母還元の不斉収率が5%と報告⁵⁵されていることから、これを条件検討の基質とし、以後種々の添加剤の効果について検討した。

まず触媒のパン酵母であるが、市販のパン酵母には生パン酵母と乾燥パン酵母の二種類がある。初めにそれぞれのパン酵母の**12a**に対する立体選択性の違いとその選択性の再現性を調べた(表2-1)。これは、それぞれ異なる時期に購入したパン酵母を用い反応を行った結果である。不斉収率に関しては乾燥パン酵母の方が再現性のある結果が得られた。また、生パン酵母は冷蔵庫中で保存しても一週間程しか活性が保てないのに対して、乾燥パン酵母は数カ月間冷蔵庫中で保存ができることから、色々な添加剤をスクリーニングする目的には乾燥パン酵母の方が再現性があり、反応を検討するための触媒と



	R^1	R^2
a:	Et	Me
b:	ClCH_2	Et
c:	Me	Et
d:	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_2$	Et
e:	ClCH_2	Me
f:	Et	Et
g:	CF_3	Et

表2-1 種々のパン酵母による3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) の還元

パン酵母	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
生 2g	<i>R</i> (D)	66	31
	<i>R</i>	37	38
	<i>R</i>	51	37
乾燥 4g	<i>R</i>	12	46
	<i>R</i>	11	61

反応条件: **12a**, 1 mmol; 水, 20 ml

してはこれの方がふさわしいと考えられる。しかし、基質が**12a**の場合、反応の立体選択性はむしろ生パン酵母の方が高い事から、高選択的な合成反応を行う場合には生パン酵母を用いるといった使い分けが必要である。

次に、それぞれのパン酵母について用いたパン酵母の量による不斉収率の変化を検討した(表2-2)。生パン酵母の場合、量が増えると不斉収率が低くなるという結果が得られた。Santanielloら⁸⁰はこれとは反対に γ -ベンゾイルアセト酢酸エチルの還元では、パン酵母を増やしていくと不斉収率が向上すると報告している。また、Wipfら⁴⁹はアセト酢酸エチル**12c**のパン酵母による還元の場合に基質濃度を低くしていくと、不斉収率が向上すると報告している。これらの現象は全て、反応がパン酵母中に含まれている異なるミカエリス定数(K_M)を持つ複数の酵素によって進行している事を示唆している。一方、乾燥パン酵母の場合は添加量の大小によって不斉収率に関する顕著な変化は観測されなかった。

パン酵母を用いて還元を行う場合に、反応系にグルコースを加える事がしばしばある。これはグルコースがペントースリン酸経路等によって代謝される際に、還元剤であるNADPHを再生するので反応が活性化されるためである。もしパン酵母中に含まれている複数の酸化還元酵素のNADPHに対するミカエリス定数がそれぞれ異なるとしたら、NADPH濃度すなわち加えるグルコースの濃度によって反応の立体選択性が影響を受けるはずである。このような観点から、**12a, b**, および**c**の三種類の β -ケトエステルについてグルコースの量による不斉収率の変化を調べた(表2-3)。ここで、生成物である β -ヒドロキシエステルの立体配置は本来RS表示で表すべきであるが、**12b**のように置換基 R^1 にハロゲン原子を含むような場合、置換基の優先順位が逆転してしまい、同じ立体選択性で得られた化合物でも表記が異なってしまうという不都合が生じる。そこで、以後立体配置をDL表示で表す事にする。D体の β -ヒドロキシエステルを生成する**12a**と**12b**はグルコースの濃度が増加するとともに不斉収率が向上している。また、興味深いことにL体の β -ヒドロキシエステルを生成する**12c**では不斉収率が減少した。何れの場合もグルコースを加えると収率が向上している事から、NADPHの濃度の増大は主にD酵素を活性化していると考えられる。

微生物による還元を行う際に、添加剤を加えて反応の立体選択性を変化さ

表2-2 パン酵母の添加量による不斉収率の変化

パン酵母	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
生 1g	<i>R</i> (D)	54	19
2g	<i>R</i>	51	37
3g	<i>R</i>	44	33
4g	<i>R</i>	33	35
乾燥 1g	<i>R</i>	10	50
2g	<i>R</i>	7	41
4g	<i>R</i>	12	46

反応条件：12a, 1 mmol; 水, 20 ml

表2-3 グルコースの添加量による不斉収率の変化

基 質	グルコース, g	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
12a	0	<i>R</i> (D)	12	46
	1	<i>R</i>	31	61
	2	<i>R</i>	43	75
12b	0	<i>S</i> (D)	4	59
	2	<i>S</i>	30	72
12c	0	<i>S</i> (L)	94	84
	2	<i>S</i>	88	88

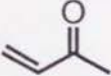
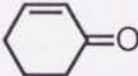

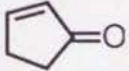
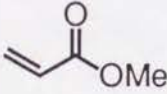
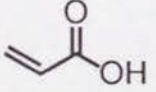
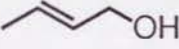

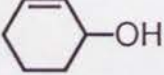
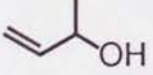
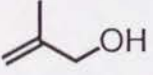
反応条件：12, 1 mmol; 水, 20 ml

せたという報告が今までに二例だけある^{54,266}。何れも反応系にアリルアルコールを加えたものである。その中で、中村ら⁵⁴は β -ケトエステルのパン酵母による還元の際にアリルアルコールを加えると、D体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られると報告している。これはおそらく、アリルアルコールがパン酵母中の酸化還元酵素によって一度酸化されアクロレインが生成し、これが酵素の活性部位近傍の求核性の置換基とマイケル付加する事によって、還元反応を阻害しているものと考えられる。そこで種々のマイケル受容体およびアリルアルコールの誘導体あるいはそれらの酸化相当体を反応系に加え、還元立体選択性に及ぼす影響について検討した(表2-4)。実験は、添加剤をパン酵母の懸濁液に加え30℃で30分間かき混ぜ処理した後、基質**12a**を加えて反応を開始した。パン酵母は生と乾燥の両方を用いたが、選択性の評価は先程も述べたように再現性などを考えて乾燥パン酵母の結果を参考にした。添加剤を何も加えない場合D体の β -ヒドロキシエステルが12%の不斉収率で得られる。しかし、添加剤を加えた場合は何れもD体のヒドロキシエステルの選択性が向上した。中でもメチルビニルケトン是最も効果的で、不斉収率が68%にまで向上した。環状の α, β -不飽和ケトンも同様に効果的であるが、 α, β -不飽和カルボン酸の誘導体ではその効果がやや小さい。またアリルアルコールは効果的であるが、その誘導体になると概して効果が小さい。

以上の結果をまとめると、立体選択的にD体の β -ヒドロキシエステルを合成するためには次の条件が必要である。即ち、生パン酵母を少量用い、メチルビニルケトンやアリルアルコールで処理し、更にグルコースを加え反応を行うというものである。この様な条件で種々の β -ケトエステルの立体選択的還元反応を検討した(表2-5)。D体の生成物が得られる基質**12a, b, d**, および**e**では何れの場合も選択性が向上し、非常に高い不斉収率で対応する β -ヒドロキシエステルが得られた。一方、添加剤で処理していないパン酵母で反応を行うと選択的にL体の生成物が得られる**12c**については、不斉収率を減少させただけで立体選択性を反転させるには至らなかった。

この様にして、パン酵母による β -ケトエステルの還元の際に種々のマイケル受容体が反応の立体選択性を向上させる事を見だし、D体のヒドロキシエステルを高選択的に合成する方法の開発に成功した(図2-2)。この方法は最も入手しやすいパン酵母で反応が行え、基質の構造を変えることなく、単に

表2-4 3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) の還元における α, β -不飽和カルボニル化合物およびアルコール類の添加の効果

添加剤	パン酵母	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
	乾燥	<i>R</i> (D)	68	51
	生	<i>R</i>	89	22
	乾燥	<i>R</i>	61	71
	生	<i>R</i>	78	50
	乾燥	<i>R</i>	60	68
	生	<i>R</i>	89	67
	乾燥	<i>R</i>	44	67
	生	<i>R</i>	66	68
	乾燥	<i>R</i>	44	63
	生	<i>R</i>	68	63
	乾燥	<i>R</i>	39	61
	生	<i>R</i>	66	34
	乾燥	<i>R</i>	23	67
	生	<i>R</i>	35	31
	乾燥	<i>R</i>	22	58
	生	<i>R</i>	61	58
	乾燥	<i>R</i>	21	67
	生	<i>R</i>	35	36
	乾燥	<i>R</i>	16	59
	生	<i>R</i>	31	30
	乾燥	<i>R</i>	16	51
	生	<i>R</i>	41	48
なし	乾燥	<i>R</i>	12	46
	生	<i>R</i>	37	38

反応条件：添加剤, 0.5 mmol; **12a**, 1 mmol; 水, 20 ml; 乾燥パン酵母, 4 g; 生パン酵母, 2 g

表2-5 β -ケトエステル類の立体選択的還元

基 質	反応条件	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
12 a	A	<i>R</i> (D)	59	54
	B	<i>R</i>	90	70
	B'	<i>R</i>	98	10
	C	<i>R</i>	96	56
	C'	<i>R</i>	98	37
12 b	A	<i>S</i> (D)	43	62
	B	<i>S</i>	68	20
	C'	<i>S</i>	85	42
12 c	A	<i>S</i> (L)	77	66
	B	<i>S</i>	47	66
	C	<i>S</i>	40	68
12 d	A	<i>R</i> (D)	64	77
	B	<i>R</i>	98	61
	B'	<i>R</i>	99	8
	C'	<i>R</i>	97	37
12 e	A	<i>S</i> (D)	52	74
	B	<i>S</i>	94	22
	C'	<i>S</i>	78	74

反応条件: **12**, 1 mmol; 水, 20 ml; 生パン酵母, 2 g; グルコース, 2 g;

A: 添加剤なし;

B: メチルビニルケトン, 0.5 mmol; B': メチルビニルケトン, 1 mmol;

C: アリルアルコール, 0.5 mmol; C': アリルアルコール, 1 mmol.

添加剤を加えるだけで反応の立体選択性が制御できるので、不斉合成反応の手法として非常に有効であると考えられる。なお、添加剤を加えた反応での詳細な反応機構については第4章で述べる。

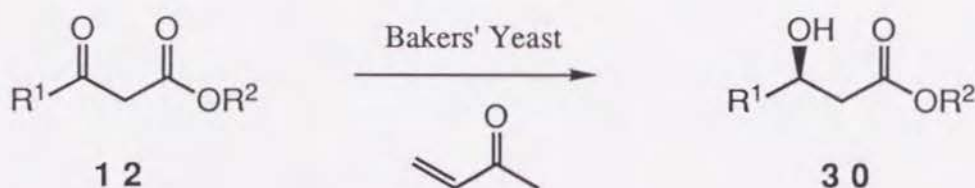


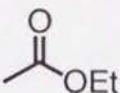
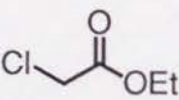
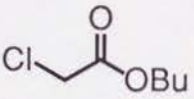
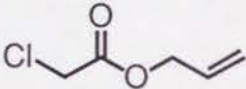
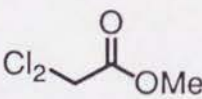
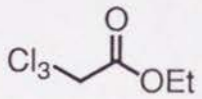
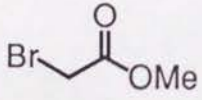
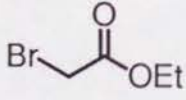
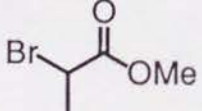
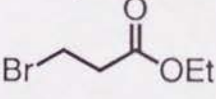
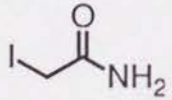
図2-2 パン酵母によるD- β -ヒドロキシエステルの合成

2.2.2 ハロエステルの添加

3-オキソペンタン酸メチル**12a**をパン酵母で還元すると、不斉収率が12%と低いことから、パン酵母中ではD酵素とL酵素がほぼ等しい割合で働いているものと考えられる。前項では β -ケトエステルを還元する際に、パン酵母をメチルビニルケトンのようなマイケル受容体で処理し、D体のヒドロキシエステルを選択的に合成する方法を開発した研究について述べた。これとは逆に、もしD酵素を阻害したりL酵素を活性化するような添加剤が見つければ、**12a**のパン酵母還元でL体の β -ヒドロキシエステルも合成できるはずである。このような観点からここでは先程と異なる添加剤について検討した。

前項で述べたように、D体の生成物を主として与える方向の反応では、マイケル受容体のような酵素のアルキル化剤が反応の立体選択性に大きな影響を与えたことから、次は別のアルキル化剤として α -ハロエステルについて検討した(表2-6)。実験は先程と同様に、添加剤をパン酵母の懸濁液に加え30℃で30分間かき混ぜ処理した後、基質**12a**を加えて反応を開始した。反応に酢酸エチルを加えても立体選択性にはまったく影響を与えないが、この α 位に塩素や臭素といったハロゲン原子を導入した α -ハロエステルを加えると、今度はL体のヒドロキシエステルの立体選択性が向上した。興味深いことに α 位のハロゲンを二置換、三置換とするとその効果はまったく無くなってしまふ。これは酵素の置換基による求核攻撃の際に立体障害が生じるためと考えられる。同様な傾向は、 α 位にメチル基を導入した2-ブロモプロピオン酸メチ

表2-6 3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) の還元におけるハロエステル類の添加の効果

添加剤	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
なし	<i>R</i> (D)	12	46
	<i>R</i>	12	61
	<i>S</i> (L)	69	20
	<i>S</i>	69	25
	<i>S</i>	5	4
	<i>R</i>	8	57
	<i>R</i>	14	45
	<i>S</i>	62	11
	<i>S</i>	65	8
	<i>R</i>	20	73
	<i>S</i>	19	55
	<i>R</i>	4	24

反応条件：**12a**, 1 mmol; 水, 20 ml; 乾燥パン酵母, 4 g; 添加剤, 0.5 mmol.

ルでも観察される。このことは、阻害反応が S_N2 型で進んでいることを示唆している。また、 β -ハロエステルを用いてもL体のヒドロキシエステルの選択性が向上するが、その効果は α -ハロエステルと比べると小さい。ここで検討したハロエステルの中ではクロロ酢酸エステルが最も良い結果を与え、69%の不斉収率でL体のヒドロキシエステルが得られた。プロモ酢酸エステルでも同程度の不斉収率が得られたが、この場合は収率がかなり低い。これはプロモ酢酸エステルの活性が高すぎるために、D酵素ばかりでなくL酵素までも阻害されたためと考えられる。

次に、収率を向上させるためにパン酵母の量を20gに増やし、クロロ酢酸エチルの濃度の効果について検討した（表2-7、図2-3）。図2-3からクロロ酢酸エチルの濃度を高くしていくとL体の β -ヒドロキシエステルの不斉収率が向上して行くが、67mMを越えると逆に不斉収率が減少していくことが分かる。また、50mMを越えると収率も減少していくことから、クロロ酢酸エチルが50mM以上の高濃度ではD酵素ばかりでなくL酵素も阻害されていると考えられる。これらの結果から、67mMの濃度のクロロ酢酸エチルでパン酵母を処理するのが最も良い結果を与えることがわかる。その結果、**12a**の還元では91%という高い不斉収率でL体の β -ヒドロキシエステルを得る事に成功した。次に、最も良い結果を与えたこの条件で、種々の β -ケトエステルの立体選択的還元反応について検討した（表2-8）。何も処理していないパン酵母を用いて反応を行うと、基質によってD体やL体の生成物が得られるが、パン酵母をクロロ酢酸エチルで処理すると何れの場合もL体の β -ヒドロキシエステルが、高い不斉収率で得られた。

この様にして、パン酵母による β -ケトエステルの還元の際に α -ハロエステルが反応の立体選択性を向上させる事を見だし、L体の β -ヒドロキシエステルを高選択的に合成する方法の開発に成功した（図2-4）。またこの事によって、 β -ケトエステルのパン酵母による還元では、添加剤を選択する事によってD体とL体の β -ヒドロキシエステルが作り分けられる様になった。この詳細な反応機構については第4章で述べる。

2.2.3 塩類の添加

種々の塩が酵素活性に影響を与える事はよく知られている。さらに、酸化

表2-7 3-オキソペンタン酸メチル (12a) の還元におけるクロロ酢酸エチルの濃度効果

濃度, mM	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
0	S(L)	15	67
25	S	69	20
33	S	81	67
50	S	81	68
67	S	91	51
83	S	78	43
100	S	71	32

反応条件：12a, 1 mmol; 水, 60 ml; 乾燥パン酵母, 20 g

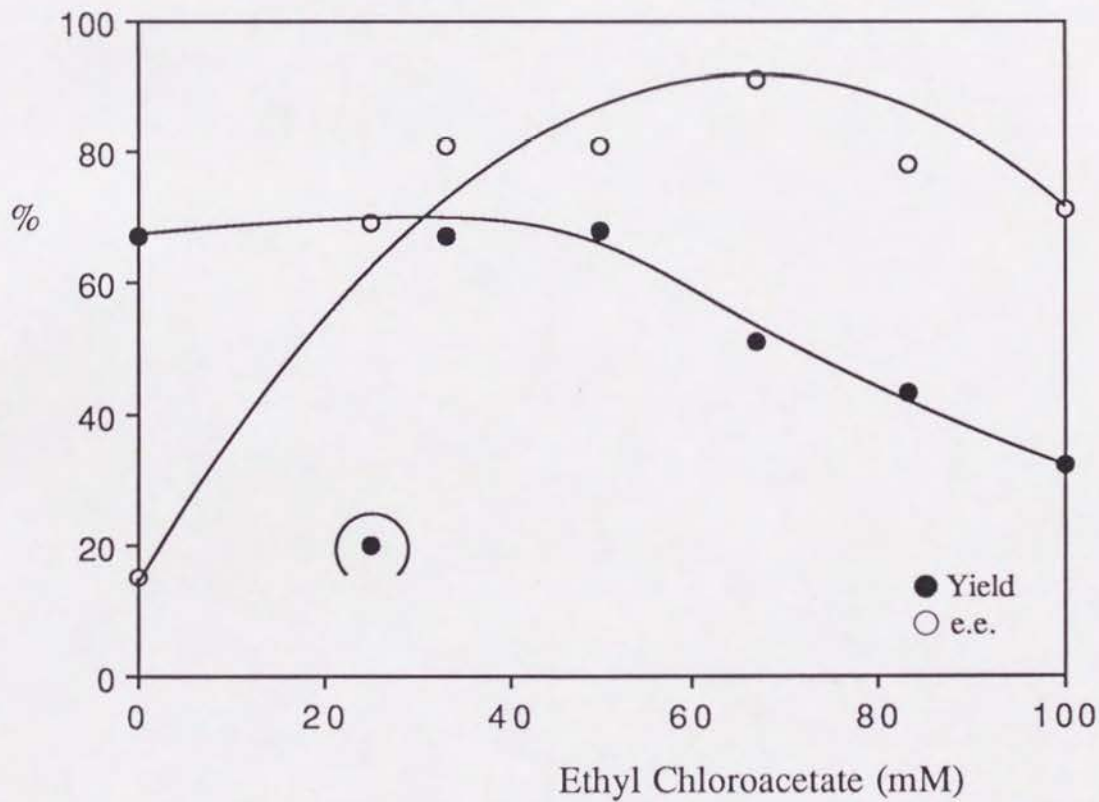


図2-3 反応の化学収率および不斉収率に対するクロロ酢酸エチルの濃度効果

表2-8 β -ケトエステル類の立体選択的還元

基 質	立体配置	不斉収率 %	化学収率 %	立体配置	不斉収率 %	化学収率 %
添加剤なし				クロロ酢酸エチル 67 mM 添加		
12 a	S(L)	15	67	S(L)	91	51
12 b	S(D)	43	62	R(L)	80	70
12 c	S(L)	77	66	S(L)	99	75
12 f	R(D)	4	61	S(L)	94	63
12 g	R(L)	69	77	R(L)	84	60

反応条件：**12**, 1 mmol; 水, 60 ml; 乾燥パン酵母, 20 g

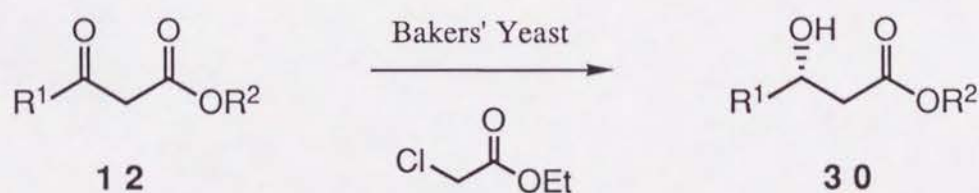


図2-4 パン酵母によるL- β -ヒドロキシエステルの合成

還元酵素等を精製した際に、これを特徴づける為に種々の塩の存在下で酵素活性を測定する事はよく行われている³⁷⁶⁻³⁸²。パン酵母による β -ケトエステルの還元のように、反応が複数の酵素によって進行している場合、ある特定の塩に対してそれぞれの酵素の活性に差があれば、反応系に塩を加える事によって還元の立体選択性が制御できるはずである。この様な観点から、**12a**のパン酵母による還元の際に種々の塩の濃度を変えて加え、反応の立体選択性に及ぼす塩の効果を検討した(表2-9)。フッ化物イオンや臭化物イオンは立体選択性にほとんど影響を与えないが、塩化物イオンを加えた場合は全てL体の β -ヒドロキシエステルが得られた。同じ塩化物イオンでもアルカリ金属の塩化物は4.0Mの濃度で何れも45-47%程度の不斉収率しか与えなかったが、アルカリ土類金属の塩化物になると2.0Mの濃度で75-80%という高い不斉収率でL体の β -ヒドロキシエステルを生成した。また、塩化アルミニウムでは水溶液の酸性度が高すぎるために、1.0Mの濃度で全ての酵素が失活してしまい反応が起こらなかった。塩化アンモニウムや塩化テトラブチルアンモニウムも効果があるが、その効果は小さい。また、硫酸塩も少しではあるが効果がある。

以上の結果を考え合わせると、塩類の添加による立体選択性の制御は単純にイオン強度や塩濃度だけでは説明する事ができない。塩化物イオンとアルカリ土類金属イオンの組み合わせを用いた時のみに高い不斉収率が得られた事から、これらのイオンに特異的な作用が有ると考えられる。

最も結果の良かった塩化マグネシウムについて更に濃度を高くすると、3.0Mの濃度で不斉収率は86%にまで向上したが化学収率が1%しかなかった。そこで収率を向上させる必要がある。酵母を安定化し収率を向上させる方法としては酵母の固定化が考えられ、固定化剤としてはアルギン酸、カラギーナン、ポリアクリルアミド、そしてポリウレタン等がある(図2-5)。

中村ら⁵⁵は以前パン酵母による β -ケトエステルの還元の際に、パン酵母を疎水性の固定化剤であるポリウレタンで固定化したところD体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られたと報告している。一方、親水性の固定化剤であるアルギン酸による固定化は不斉収率には影響を与えなかった。また、アルギン酸は塩化カルシウムのような2価の金属イオンを用いて固化させるので、その代わりに塩化マグネシウムを使う事もできる。そこで、アルギン酸

表2-9 3-オキソペンタン酸メチル (12a) の還元における塩類の添加の効果

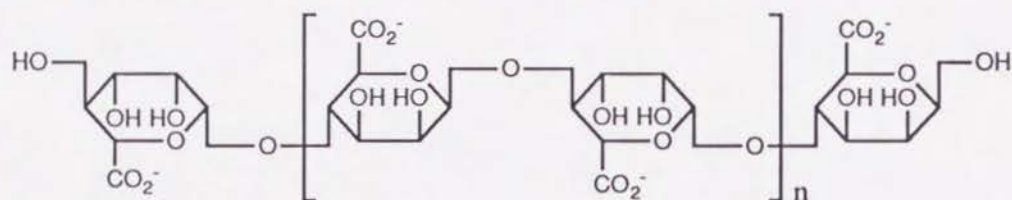
添加剤	濃度, M	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
None		R(D)	12	46
LiF	0.03	S(L)	16	56
KF	0.01	S	22	30
	0.03	S	15	39
	0.05	R	19	31
	0.2		反応せず	
NaCl	2.0	S	43	37
	4.0	S	47	14
KCl	1.0	S	8	54
	2.0	S	24	47
	4.0	S	45	41
MgCl ₂	1.0	R	19	43
	2.0	S	80	20
	2.5	S	83	4
	3.0	S	86	1
	4.0		反応せず	
CaCl ₂	1.0	R	24	68
	2.0	S	75	19
AlCl ₃	0.5	S	28	12
	1.0		反応せず	
NH ₄ Cl	2.0	S	17	40

表2-9の続き

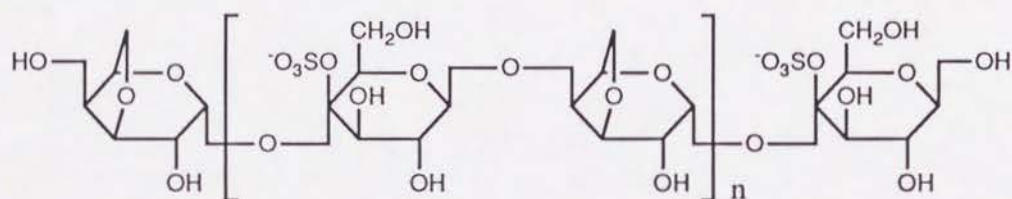
Bu ₄ NCl	0.3	S	19	38
	2.0		反応せず	
NaBr	1.0	R	18	54
	2.0	R	10	48
	4.0		反応せず	
KBr	1.0	R	9	57
	2.0	R	20	48
	4.0		反応せず	
Na ₂ SO ₄	2.0	S	28	20
MgSO ₄	2.0	S	18	52
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0	S	11	23

反応条件：12a, 1 mmol; 水, 20 ml; 乾燥パン酵母, 4 g

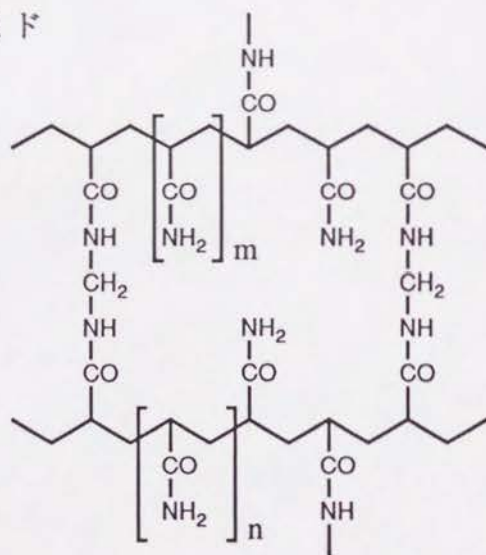
アルギン酸



κ-カラギーナン



ポリアクリルアミド



ポリウレタン

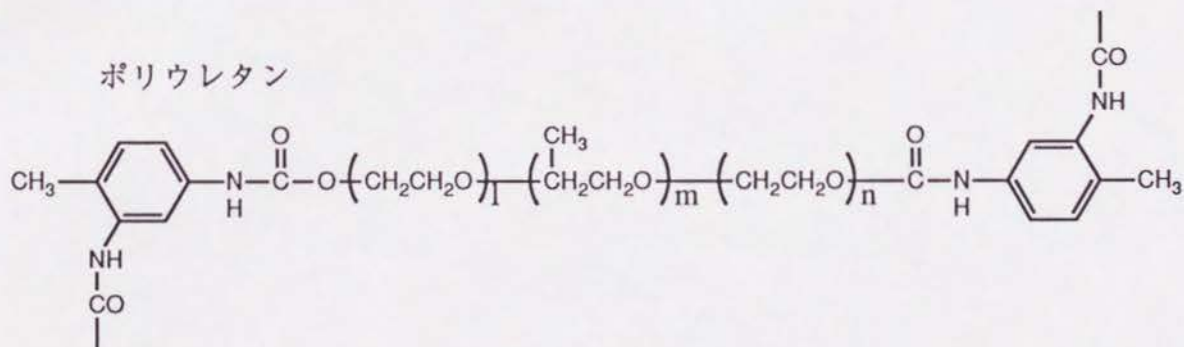


図2-5 種々の固定化剤

は塩化マグネシウムを添加する場合に最も都合がよい固定化剤であると考えられる。従って固定化剤としてアルギン酸マグネシウムを用い、種々の塩濃度で**12a**の還元を行った(表2-10)。添加剤を何も加えていない場合18%の不斉収率でL体の β -ヒドロキシエステルが得られた。表に示したように三種類の塩化物について検討したが、何れの場合も先程と同じようにL体の β -ヒドロキシエステルが得られた。塩化マグネシウムと塩化カルシウムについては、固定化していない場合と比べて不斉収率と化学収率が共に向上したが、塩化カリウムではどちらも減少した。また、固定化した場合でもやはり塩化マグネシウムが最も良い結果を与えた。この最も良かった条件を用いて種々の β -ケトエステルの立体選択的な還元反応を検討した(表2-11)。通常のパン酵母還元では基質によってD体の生成物を与えたりL体の生成物を与えたりしているが、アルギン酸マグネシウムでパン酵母を固定化し、更に高濃度の塩化マグネシウムを加える事によって、全ての基質でL体の β -ヒドロキシエステルを得ることに成功した。

この様にして、パン酵母による不斉還元の立体選択性を制御する三種類の方法を見だし、 β -ヒドロキシエステルの立体選択的な合成方法を開発した。これらの方法は扱い易い生体触媒、中でも最も入手しやすいパン酵母で反応が行え、基質の構造を変えることなく、単に添加剤を加えるだけで反応の立体選択性が制御でき、しかもその添加剤を選択することによってD体とL体の β -ヒドロキシエステルが作り分けられることから、不斉合成反応の手法として非常に有効であると考えられる(図2-6)。

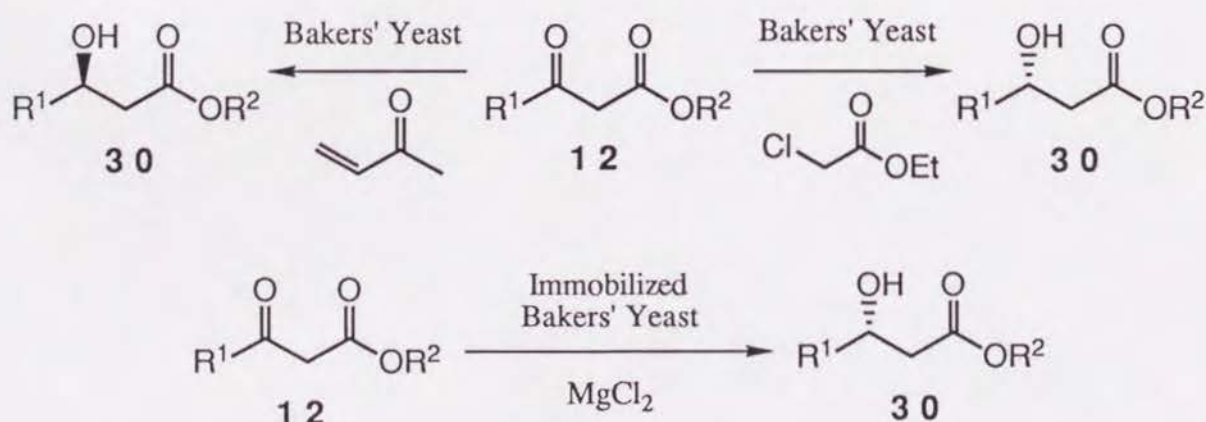


図2-6 パン酵母による光学活性な β -ヒドロキシエステルの作り分け

表2-10 3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) の固定化パン酵母による還元における塩類の添加の効果

添加剤	濃度, M	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
なし		S(L)	18	53
KCl	2.2	S	27	53
	10	S	36	25
	20	S	35	11
MgCl ₂	1.0	S	72	52
	2.0	S	81	58
	3.0	S	82	41
	4.0	S	89	44
	5.0		反応せず	
CaCl ₂	2.0	S	84	47
	3.0	S	67	16
	4.0		反応せず	

反応条件：アルギン酸マグネシウム固定化パン酵母, 45 g; **12a**, 1 mmol;
水, 10 ml;

表2-11 β -ケトエステル類の立体選択的還元

基 質	反応条件	立体配置	不斉収率, %	化学収率, %
12 a	A	R(D)	12	46
	B'	S(L)	89	44
12 b	A	S(D)	43	62
	B	R(L)	64	50
12 c	A	S(L)	77	66
	B	S(L)	99	65
12 d	A	R(D)	64	77
	B	S(L)	46	8
12 e	A	S(D)	52	74
	B	R(L)	45	9
12 f	A	R(D)	4	61
	B	S(L)	69	10
12 g	A	R(L)	69	77
	B'	R(L)	71	6

反応条件： **12**, 1 mmol; A: 乾燥パン酵母, 4 g, 水, 20 ml; B: 固定化パン酵母, 45 g, 水, 10 ml, MgCl_2 , 3 M; B': 固定化パン酵母, 45 g, 水, 10 ml, MgCl_2 4 M.

2.3 実験の部

測定機器

^1H NMRスペクトルはVarian VXR-200フーリエ変換NMR測定装置およびJEOL GX-400フーリエ変換NMR測定装置を用いて測定した。ガスクロマトグラフ分析はYanaco G-2800ガスクロマトグラフ分析装置により行った。キャピラリーガスクロマトグラフ分析はShimazu GC-14Aガスクロマトグラフ分析装置を使用した。分取ガスクロマトグラフィーはVarian Aerograph Model 920ガスクロマトグラフ装置を用いた。高速液体クロマトグラフ分析はHitachi 655A-11高速液体クロマトグラフおよびIRICA 852-Ⅲ紫外検出器を用いて測定した。旋光度はPerkin-Elmer 241旋光度計により測定した。

試薬

種々の試薬は市販のものを精製することなく使用した。パン酵母はオリエンタル酵母工業株式会社の生パン酵母と乾燥パン酵母を使用した。反応に使用した水は水道水である。

生パン酵母による3-オキソペンタン酸メチル (12a) の還元

生パン酵母2 gを水20 mlに懸濁させ、3-オキソペンタン酸メチル (12a) を1 mmol加え、30℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 130℃)によって精製分取し、対応するβ-ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-1, 2-2に示す。

乾燥パン酵母による3-オキソペンタン酸メチル (12a) の還元

乾燥パン酵母4 gを水20 mlに懸濁させ、3-オキソペンタン酸メチル (12a) を1 mmol加え、30℃で1日かき混ぜる。反応終了後、Hyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ (PEG-20M, 1.5 m, 130℃) によって精製分取し、対応するβ-ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-1, 2-2に示す。

添加剤で処理したパン酵母による3-オキソペンタン酸メチル(**12a**)の還元

乾燥パン酵母4 gを水20 mlに懸濁させ、添加剤0.5 mmolを加え30 ℃で30分かき混ぜる。その後3-オキソペンタン酸メチル(**12a**)を1 mmol加え、30 ℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 130 ℃)によって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-4, 2-6に示す。

添加剤で処理した生パン酵母による β -ケトエステル(**12**)の還元

生パン酵母2 gを水20 mlに懸濁させ、添加剤0.5 mmolあるいは1 mmolを加え30 ℃で30分かき混ぜる。その後 β -ケトエステル(**12**)を1 mmolとグルコース2 gを加え、30 ℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 130 ℃: **30a**, **30c**, 160 ℃: **30b**, **30d**, **30e**)によって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-5に示す。

クロロ酢酸エチルで処理した乾燥パン酵母による β -ケトエステル(**12**)の還元

乾燥パン酵母20 gを水60 mlに懸濁させ、クロロ酢酸エチル4 mmolを加え30 ℃で1時間かき混ぜる。その後 β -ケトエステル(**12**)を1 mmolを加え、30 ℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 10 gと酢酸エチル60 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、対応するヒドロキシエステルを得た。収率を表2-7, 2-8に示す。

塩を加えた乾燥パン酵母による3-オキソペンタン酸メチル(**12a**)の還元

乾燥パン酵母4 gを塩の水溶液20 mlに懸濁させ30 ℃で30分かき混ぜる。そ

の後3-オキソペンタン酸メチル (**12a**) を1 mmol加え、30℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 130℃)によって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-9に示す。

アルギン酸マグネシウムによる乾燥パン酵母の固定化

アルギン酸ナトリウム1.5 gを25 mlの熱水にとかし、氷浴で冷やす。一方、乾燥パン酵母10 gを25 mlの水に懸濁させ、アルギン酸ナトリウムの水溶液と混合する。この混合液を4℃、200 mlの塩化マグネシウム水溶液に滴下し、2時間かき混ぜ固定化する。ろ過した後、水で洗浄すると固定化パン酵母45 gが得られる。

固定化パン酵母による β -ケトエステル (**12**) の還元

塩化マグネシウム水溶液(3 Mあるいは4 M)10 mlに固定化パン酵母45 gを加え30℃で30分間振盪する。その後 β -ケトエステル (**12**) を1 mmol加え、30℃で1日振盪する。反応終了後、反応液に酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 130℃: **30a**, **30c**, **30f**, 160℃: **30b**, **30d**, **30e**, **30g**)によって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステルを得た。収率を表2-10, 2-11に示す。

β -ヒドロキシエステル (**30**) の同定用分析データ

3-ヒドロキシペンタン酸メチル(**30a**)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ =0.95(t, 3H, J =7.5Hz), 1.43-1.59(m, 2H), 2.31-2.57(m, 2H), 2.92(s, 1H), 3.69(s, 3H), 3.87-3.99(m, 1H).

4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチル(**30b**)

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ =1.25(t, 3H, J =7.5Hz), 2.59-2.62(m, 2H), 3.22(s, 1H), 3.59(d, 2H, J =5.0Hz), 4.17(q, 2H, J =7.5Hz), 4.15-4.29(m, 1H).

3-ヒドロキシブタン酸エチル(30c)

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ =1.21(d, 3H, 6.2Hz), 1.26(t, 3H, J =7.1Hz), 2.40-2.46(m, 2H), 3.03(s, 1H), 4.14(q, 2H, J =7.1Hz).

3-ヒドロキシ-6-ヘプテン酸エチル(30d)

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ =1.23(t, 3H, J =7.0Hz), 1.47-1.69(m, 2H), 2.08-2.22(m, 2H), 2.30-2.53(m, 2H), 3.05(s, 1H), 3.93-4.05(m, 1H), 4.13(q, 2H, J =7.0Hz), 4.91-5.06(m, 2H), 5.69-5.89(m, 1H).

4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸メチル(30e)

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ =2.59-2.62(m, 2H), 3.22(s, 1H), 3.59(d, 2H, J =5.0Hz), 3.70(s, 3H), 4.15-4.29(m, 1H).

3-ヒドロキシペンタン酸エチル(30f)

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ =0.94(t, 3H, J =7.6Hz), 1.25(t, 3H, J =7.4Hz), 1.42-1.59(m, 2H), 2.30-2.56(m, 2H), 2.99(s, 1H), 3.85-3.98(m, 1H), 4.15(q, 2H, J =7.4Hz).

3-ヒドロキシ-4,4,4-トリフルオロブタン酸エチル(30g)

^1H NMR (CDCl_3 , TMS) δ =1.29(t, 3H, J =6.3Hz), 2.67-2.71(m, 2H), 3.55(s, 1H), 4.20(q, 2H, J =6.3Hz), 4.36-4.50(m, 1H).

これらの ^1H NMRスペクトルを図2-7～2-13に示す。

β -ヒドロキシエステル(30)のMTPAエステル化

アルゴンガス雰囲気下、乾燥ベンゼン1 mlに β -ヒドロキシエステル(30)を0.03 mmolと乾燥ピリジン1.5 mmol、(R)-(+)- α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニル酢酸クロリド(MTPACl) 0.2 mmolを加え室温で一晩かき混ぜる。反応終了後、反応液に酢酸エチルと水を加え抽出する。有機層を1 M塩酸、飽和炭酸ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下に濃縮して対応するMTPAエステルを得る。収率は90%以上である。

β -ヒドロキシエステル(30)の不斉収率の決定

β -ヒドロキシエステル(30)を対応するMTPAエステルに変換し、その高速液体クロマトグラフの面積比から不斉収率を決定した。クロマトグラムの例を図2-14に示す。

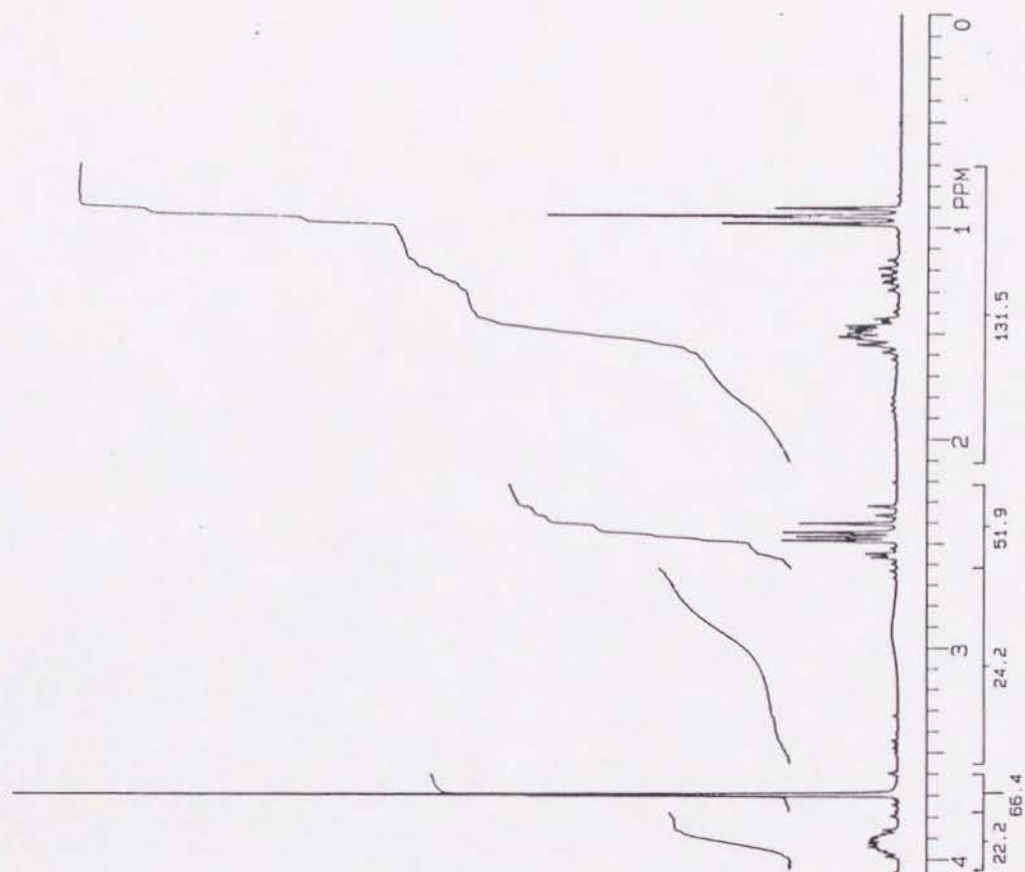
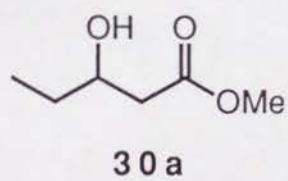


図2-7 3-ヒドロキシペンタン酸メチル (30a) の ^1H NMRスペクトル

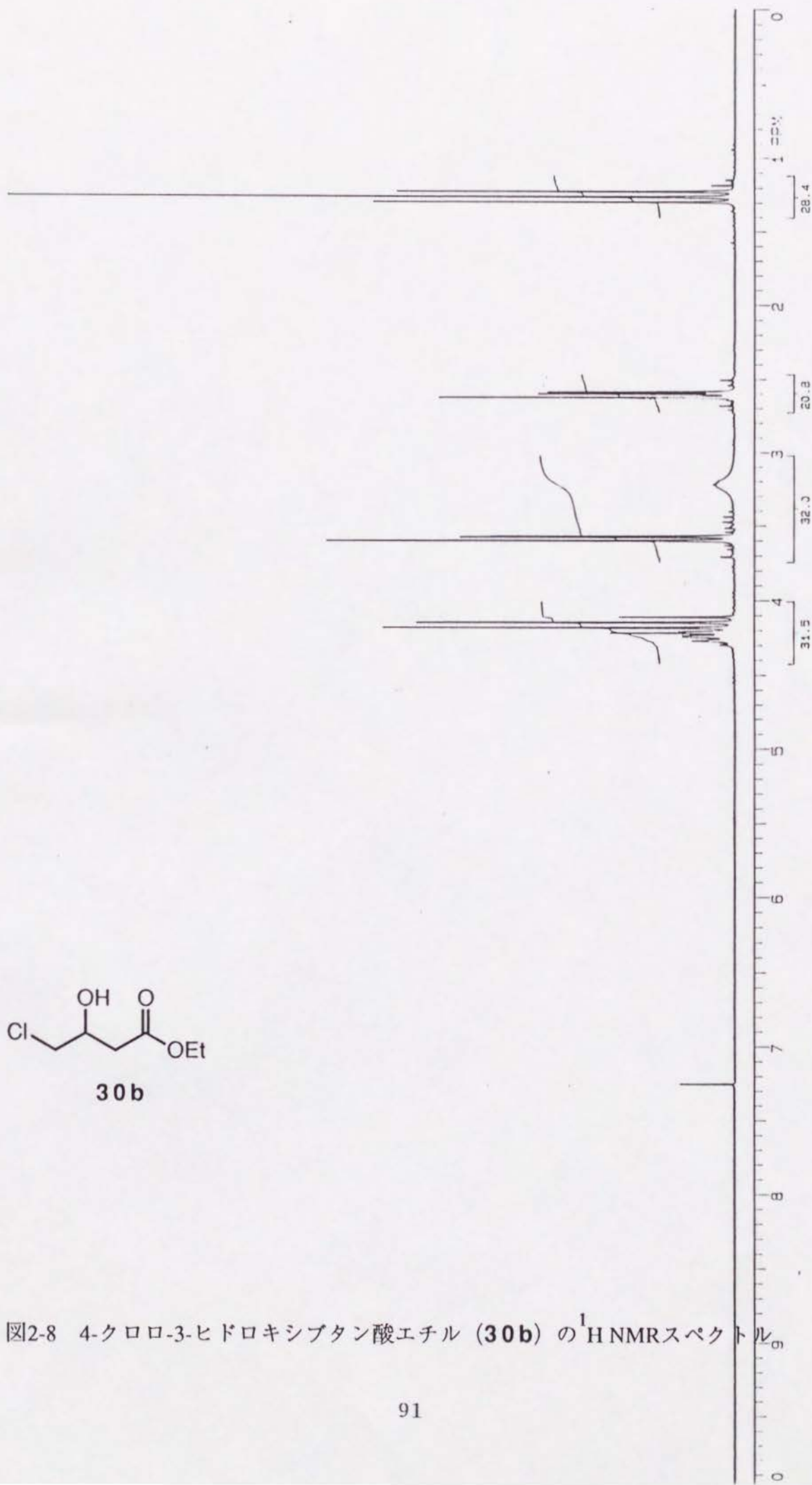


図2-8 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチル (**30b**) の¹H NMRスペクトル

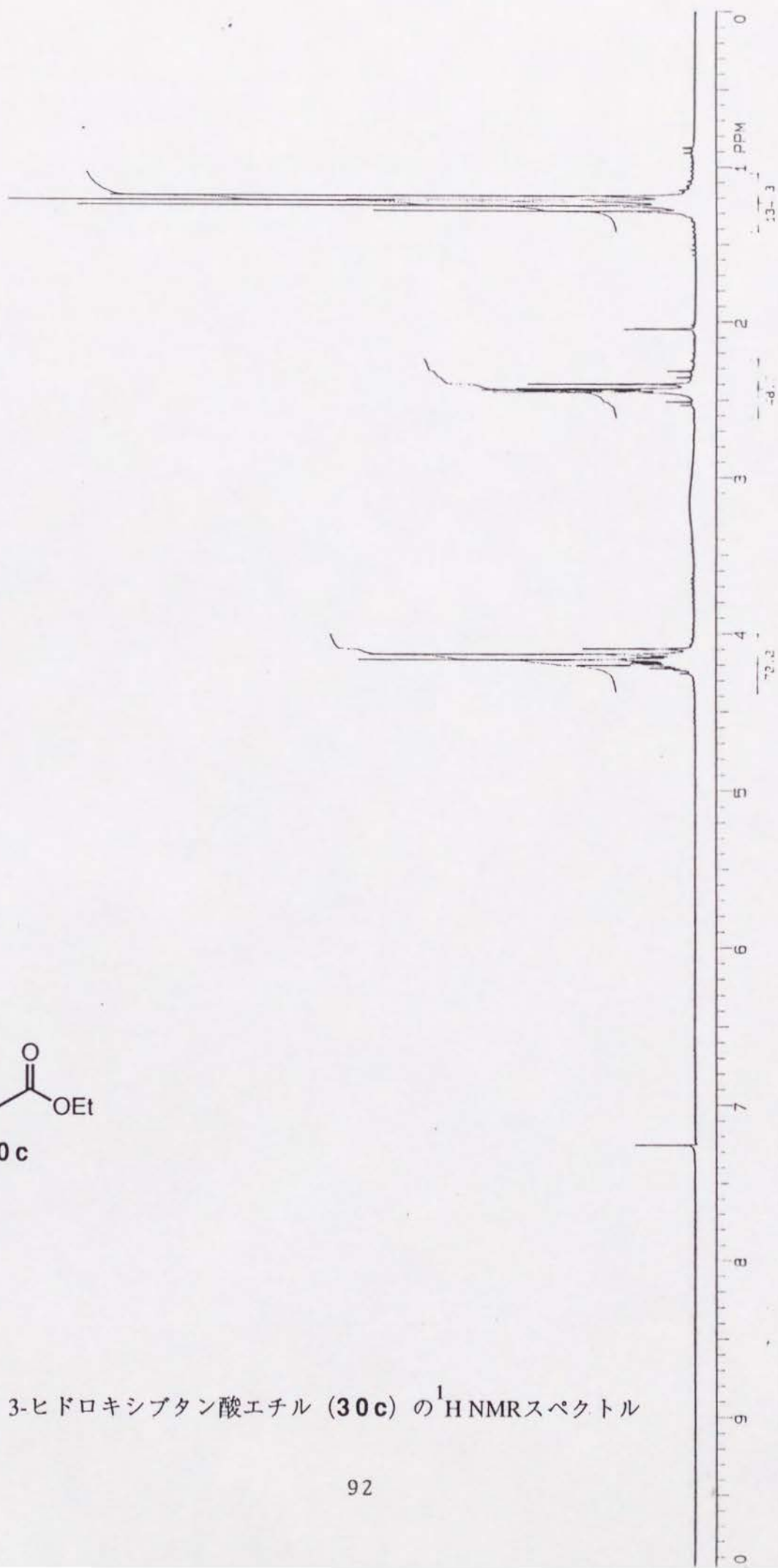
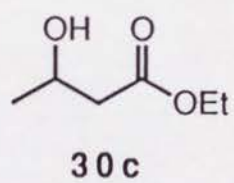


図2-9 3-ヒドロキシブタン酸エチル (30c) の ^1H NMRスペクトル

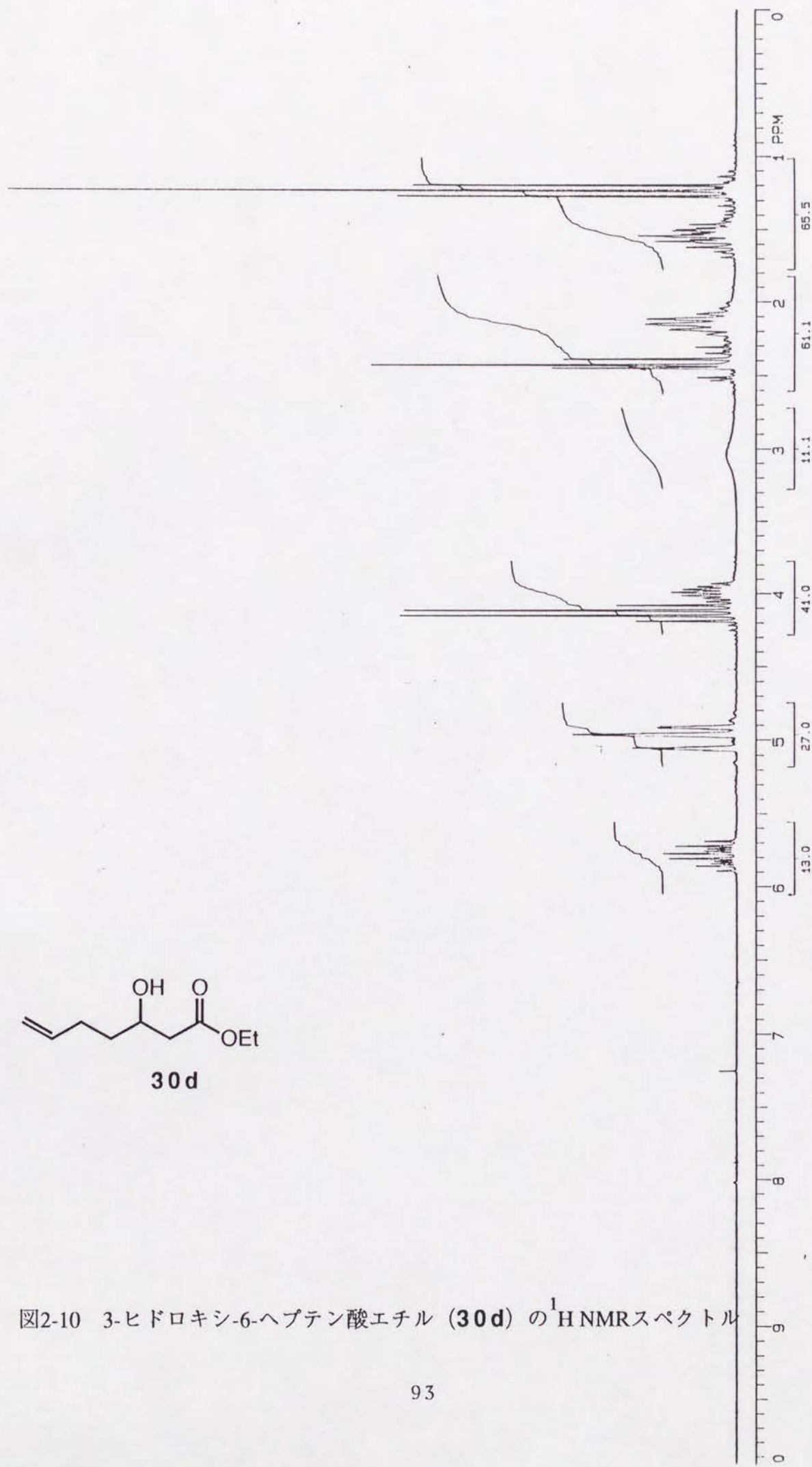
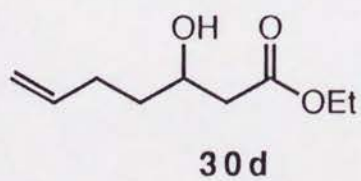


図2-10 3-ヒドロキシ-6-ヘプテン酸エチル (**30d**) の¹H NMRスペクトル

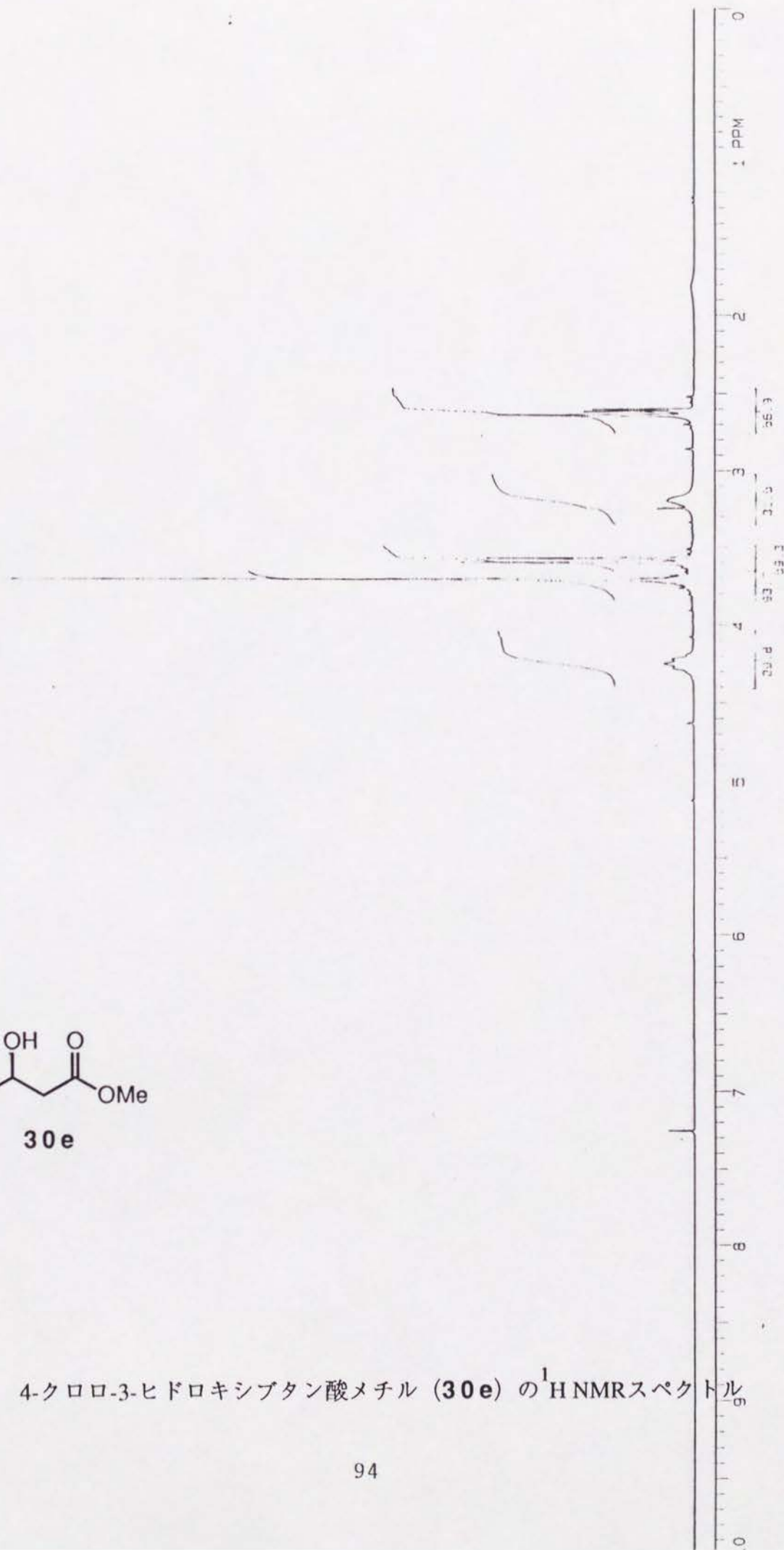
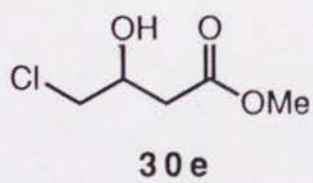


図2-11 4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸メチル (**30e**) の ^1H NMRスペクトル

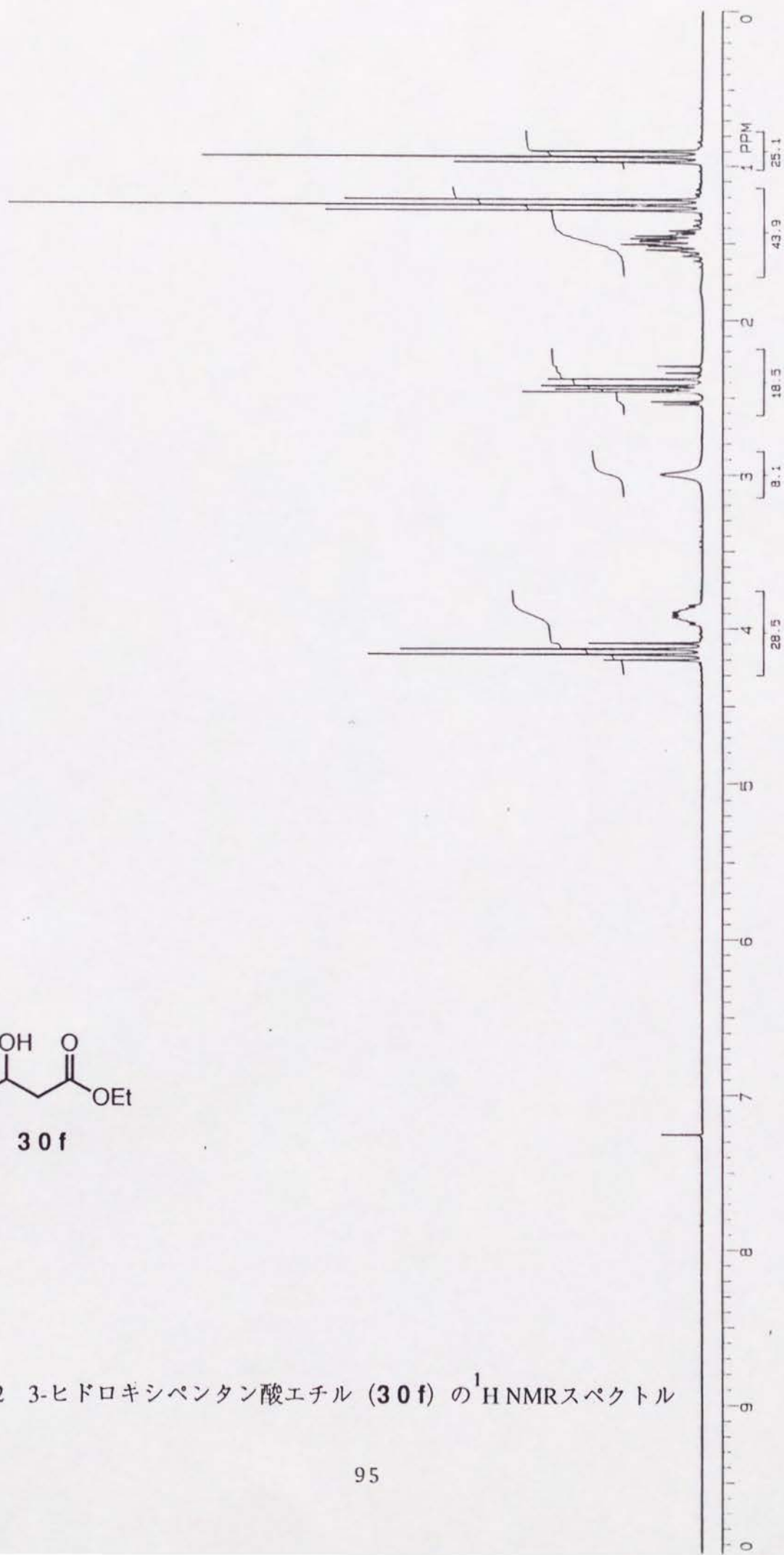
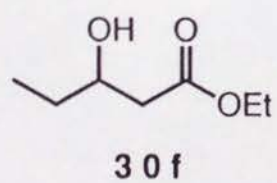


図2-12 3-ヒドロキシペンタン酸エチル (**30f**) の ^1H NMRスペクトル

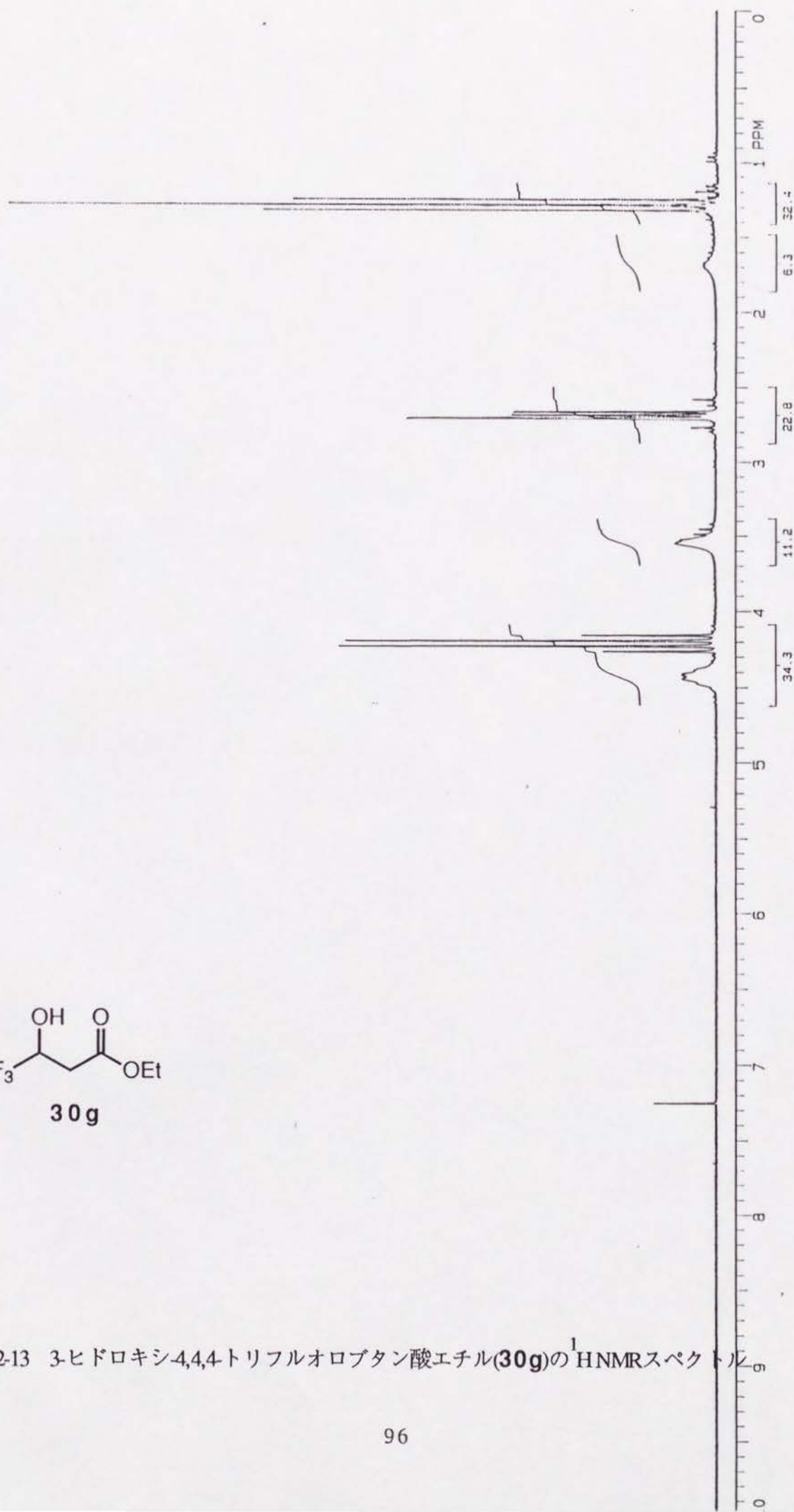
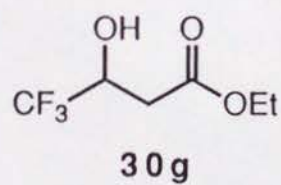


図2-13 3-ヒドロキシ-4,4,4-トリフルオロブタン酸エチル(30g)の ^1H NMRスペクトル

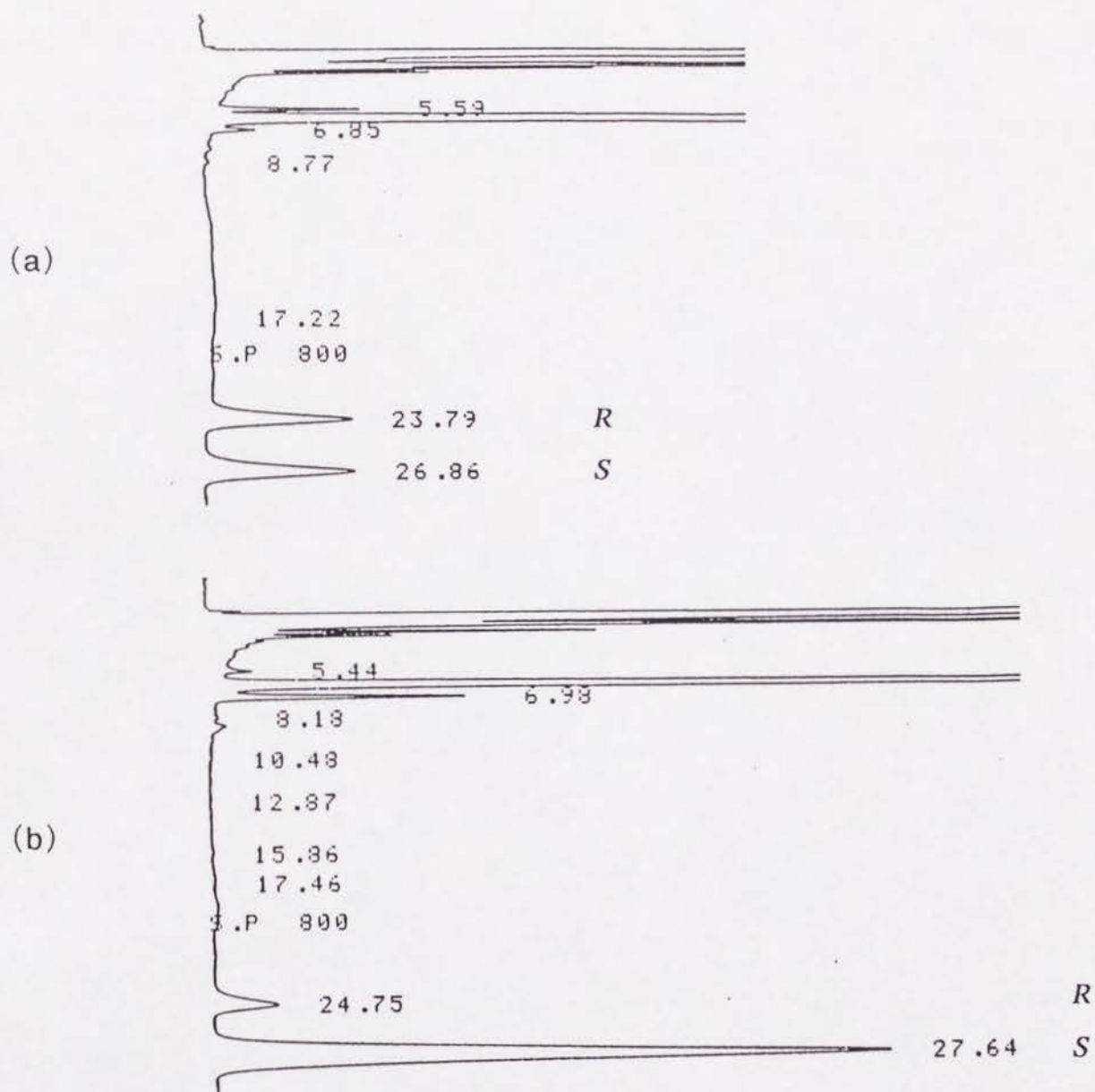


図2-14 3-ヒドロキシペンタン酸メチル (30a) のMTPAエステルのクロマトグラム
(a) ラセミ体 (b) パン酵母還元生成物

第3章 パン酵母による不斉還元の立体選択性に及ぼす添加剤および熱処理の効果

3.1 序論

光学活性な α -アルキル- β -ヒドロキシエステルは2点の不斉中心を有し、他の化合物への変換が容易な事から、生理活性物質や天然物の重要な合成中間体として数多くの研究者に利用されている^{119,383,384}。この化合物は1.3.2.1および図1-5で示したように4種類の光学異性体が存在し、その何れもが重要な合成中間体である。

光学活性な α -アルキル- β -ヒドロキシエステルを得る方法としては、不斉アルドール縮合、 β -ヒドロキシエステルの選択的アルキル化反応、加水分解酵素による光学分割、および α -アルキル- β -ケトエステルの不斉還元等が考えられる。不斉アルドール縮合に関しては1.2で詳しく述べたが¹⁸⁻²⁴、その何れもが不斉源を化学量論的に用いなくてはならない反応で、触媒的な不斉反応の例はほとんど無い。また、光学活性なヒドロキシエステルのアルキル化は¹¹⁹、塩基によってジアニオンを発生させアルキル化するという方法であるが、この方法はアンチ体の立体配置を持つヒドロキシエステルの合成に限られる(図3-1)。加水分解酵素による光学分割³⁸⁵では、シン体とアンチ体をクロマトグラフィーによって分割した後に反応を行っているが、完全なラセミ体からは最大で25%の収率でしか光学活性体を得られない。一方、 α -アルキル- β -ケトエステルの不斉還元には化学的な方法と生体触媒による方法とがある。化学的な不斉還元法として野依らは³⁸⁶ BINAP-Ru錯体を用いた選択的な不斉水素化に成功している。しかしこの方法で、エナンチオ選択的かつジアステレオ選択的な反応は α 位の置換基がN-アシル基のものに限られ、置換基がアルキル基の場合はエナンチオ選択性は良いが、ジアステレオ選択性は全く無く、シン体とアンチ体の混合物が得られる(図3-2)。また、生体触媒を用いる方法は1.3.2.1および表1-2で詳しく述べたように、さまざまな微生物によって還元が行われている。パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステルの還元の場合エナンチオ選択性は非常に高く、L体の α -アルキル- β -ヒドロキシエステルが選択的に得られるが、ジアステレオ選択性は余り良くない。そのため、1.3.3で述べたように微生物のスクリーニング^{97,120,129,131-137}や基質

の修飾^{90,95,96,98}を行うことによって高い選択性を出し、このβ-ヒドロキシエステルを得ている。

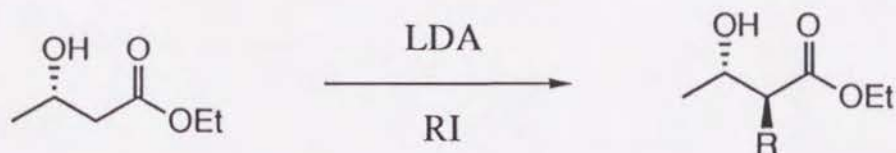


図3-1 β-ヒドロキシエステルのアルキル化

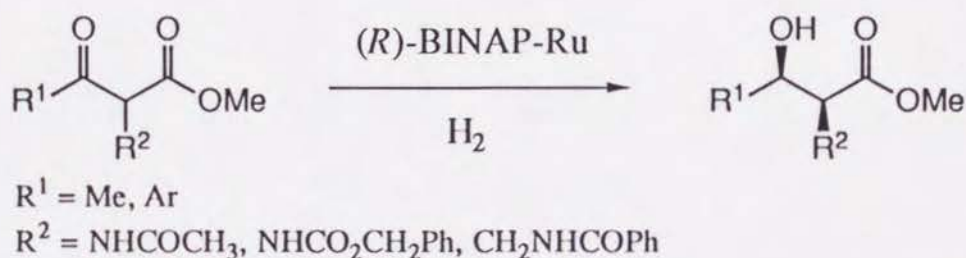


図3-2 α-置換-β-ケトエステルの不斉還元

第2章に於いて、パン酵母によるβ-ケトエステルの還元は、反応条件を変えるだけでD体のβ-ヒドロキシエステルとL体のβ-ヒドロキシエステルが簡単に作り分けられる事を明らかにした。この反応は、生体触媒の中で最も入手が容易で扱い易いパン酵母で行える事から、不斉合成の手段として簡便かつ有効な方法であると考えられる。もしこの様な方法がα-アルキル-β-ケトエステルの還元反応にも応用できるならば、2点の不斉中心を有するα-アルキル-β-ヒドロキシエステルが簡便に合成できる事になり、不斉合成反応の手段として極めて有効であると考えられる。

この様な観点から、種々の反応条件がパン酵母によるα-アルキル-β-ケトエステルの還元に及ぼす影響を調べ、立体選択的な反応の開発について検討した。その結果を本章で詳述する。

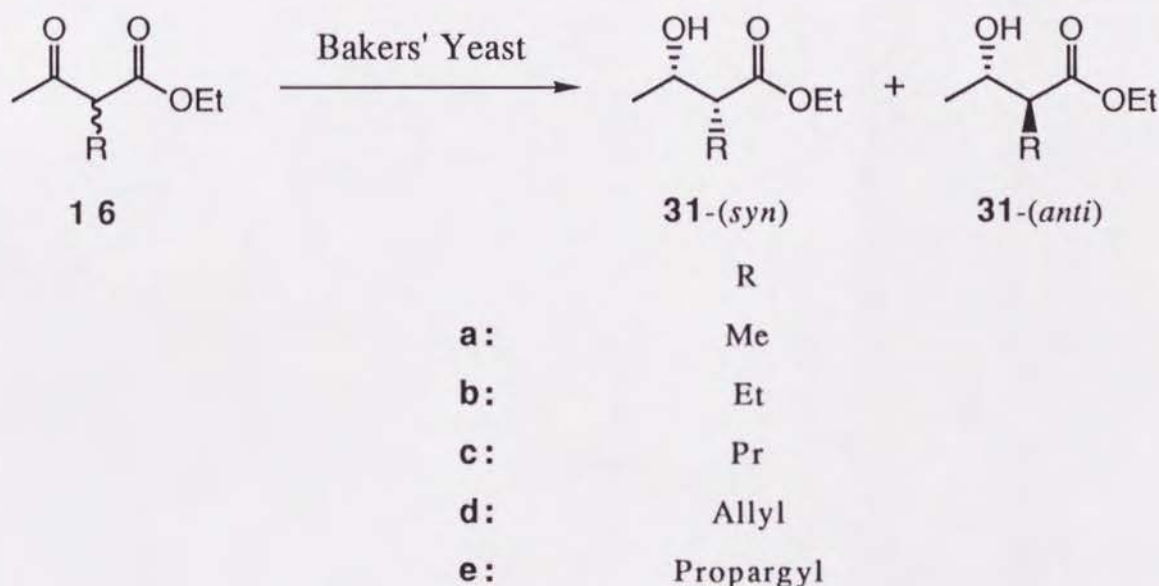
3.2 本論

3.2.1 添加剤の効果

パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステルの還元のアステレオ選択性が悪い原因が、 β -ケトエステルの場合と同様に複数の酵素が反応に関与しているためであるならば、第2章で明らかにした様に反応条件を変えるだけで選択性を制御できる可能性がある。そこで種々の反応条件が立体選択性に及ぼす効果について検討した。

阻害剤を添加する事によって、パン酵母による β -ケトエステルの不斉還元の立体選択性が制御できる事を第2章で明らかにした。この方法が α -アルキル- β -ケトエステルの還元にも応用できるのではないかと考え、阻害剤がこの反応のアステレオ選択性に及ぼす効果について検討した。

α -アルキル- β -ケトエステルのパン酵母還元ではL体の生成物しか得られない事から、反応はL-酵素だけで進行している事がわかる。したがってL-酵素の中にシン体を生成する酵素とアンチ体を生成する酵素が含まれていると考えられる。第2章で述べた反応系では種々の阻害剤の中でメチルビニルケトンがL-酵素をより強く阻害していた事から、これを阻害剤として用いて反応のアステレオ選択性に及ぼす効果について検討した。



シン体を与えはするがその傾向の低い**16b**と、アンチ選択性を示す**16d**をそれぞれ基質に選び、メチルビニルケトンの濃度を変化させて還元のアステレオ

テレオ選択性に及ぼす効果について詳しく検討した（図3-3）。実験はメチルビニルケトンを用いたパン酵母の懸濁液に加え30℃で1時間かき混ぜ処理した後、基質**16**を加えて反応を開始した。反応のジアステレオ選択性はキャピラリーガスクロマトグラフィーによって決定した³⁹¹。図3-3より**16b**と**16d**いずれの基質でもメチルビニルケトンを添加するとシン体の選択性が向上している事がわかる。何も加えていない場合にアンチ体を与える**16d**でさえ、パン酵母を処理する事によってシン体を与えるようになる。しかし添加剤を100 mM以上の濃度で加えると、逆に選択性が低下していく傾向がみられる。どちらの基質においても83 mMの場合が一番選択性が良い結果が得られたので、この条件で**16a-e**の基質を還元した。それぞれ92、72、70、60、そして82%のd.e. (diastereomeric excess) で相当するヒドロキシエステル**31a-e**が得られた（表3-1）。

このようにして、パン酵母をメチルビニルケトンで処理する事によって反応の立体選択性を制御し、シン選択的な還元反応を行う事に成功した。しかしこの方法単独では、不斉合成反応の手段として用いることを考えると、まだまだ選択性は低いと言わざるを得ない。

3.2.2 熱処理の効果

パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステルの還元のジアステレオ選択性をさらに向上させるために、別の反応条件を検討することにした。

酵素、特に酸化還元酵素は熱的に不安定であり、単離された酵素では50℃程度の温度で失活してしまうのがほとんどである^{377-380,387-390}。パン酵母による還元反応が複数の酵素によって進行している場合、もしそれぞれの酵素の熱的な安定性が異なっているとすれば、パン酵母を熱処理する事によって選択性に差がでるはずである。このような観点から熱処理したパン酵母を用いて**16**の還元を行うことにした。

パン酵母を60℃以上の温度で熱処理すると、パン酵母は完全に失活してしまい反応が進行しなかったため熱処理温度を50℃とし、熱処理時間を種々変化させて還元立体選択性に及ぼす効果を詳しく検討した（表3-2、図3-4）。実験はパン酵母の懸濁液を50℃で適当な時間かき混ぜ加熱処理した後、反応溶液を30℃にし基質**16**を加えて反応を開始した。図3-4より何れの基質でも

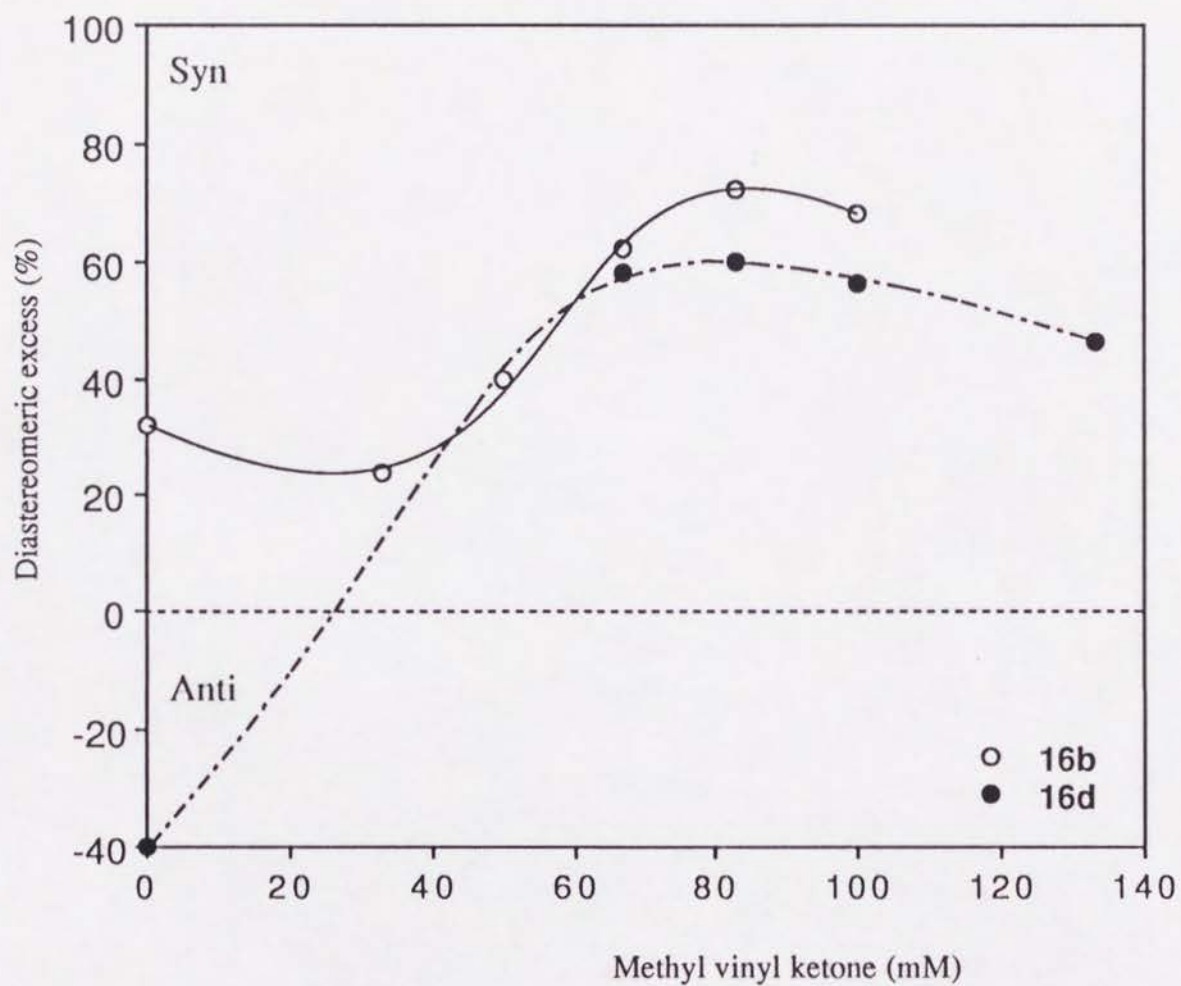


図3-3 α -置換- β -ケトエステル (16) の還元におけるメチルビニルケトンの添加量の効果

表3-1 α -置換- β -ケトエステル (**16**) の還元におけるメチルビニルケトン
の添加量の効果

基質	MVK濃度, mM	Syn / Anti	変換率, %
16 a	0	87 / 13	99
	83	96 / 4	96
16 b	0	66 / 34	99
	33	62 / 38	99
	50	70 / 30	99
	67	81 / 19	96
	83	86 / 14	97
	100	84 / 16	93
16 c	0	74 / 26	99
	83	85 / 15	98
16 d	0	30 / 70	99
	67	79 / 21	99
	83	80 / 20	93
	100	78 / 22	72
	133	73 / 27	44
16 e	0	66 / 34	97
	83	91 / 9	92

反応条件：**16**, 1 mmol; 水, 60 ml; 乾燥パン酵母, 20 g; グルコース, 4 g

表3-2 α -置換- β -ケトエステル (16) の還元におけるパン酵母の熱処理時間の効果

基質	熱処理時間, 分	Syn / Anti	変換率, %
16 a	0	87 / 13	99
	20	93 / 7	98
	30	93 / 7	92
	40	91 / 9	96
16 b	0	66 / 34	99
	20	69 / 31	99
	30	80 / 20	91
	40	73 / 27	98
16 c	0	74 / 26	99
	20	76 / 23	69
	30	92 / 8	71
	40	79 / 21	97
16 d	0	30 / 70	99
	15	40 / 60	99
	20	52 / 48	99
	25	53 / 47	92
	30	65 / 35	92
	40	62 / 38	97
	60	58 / 42	93
16 e	0	66 / 34	97
	20	77 / 23	99
	30	86 / 14	99
	40	83 / 17	99
	50	82 / 18	99

反応条件：16, 1 mmol; 水, 20 ml; 乾燥パン酵母, 4 g; 熱処理, 50℃

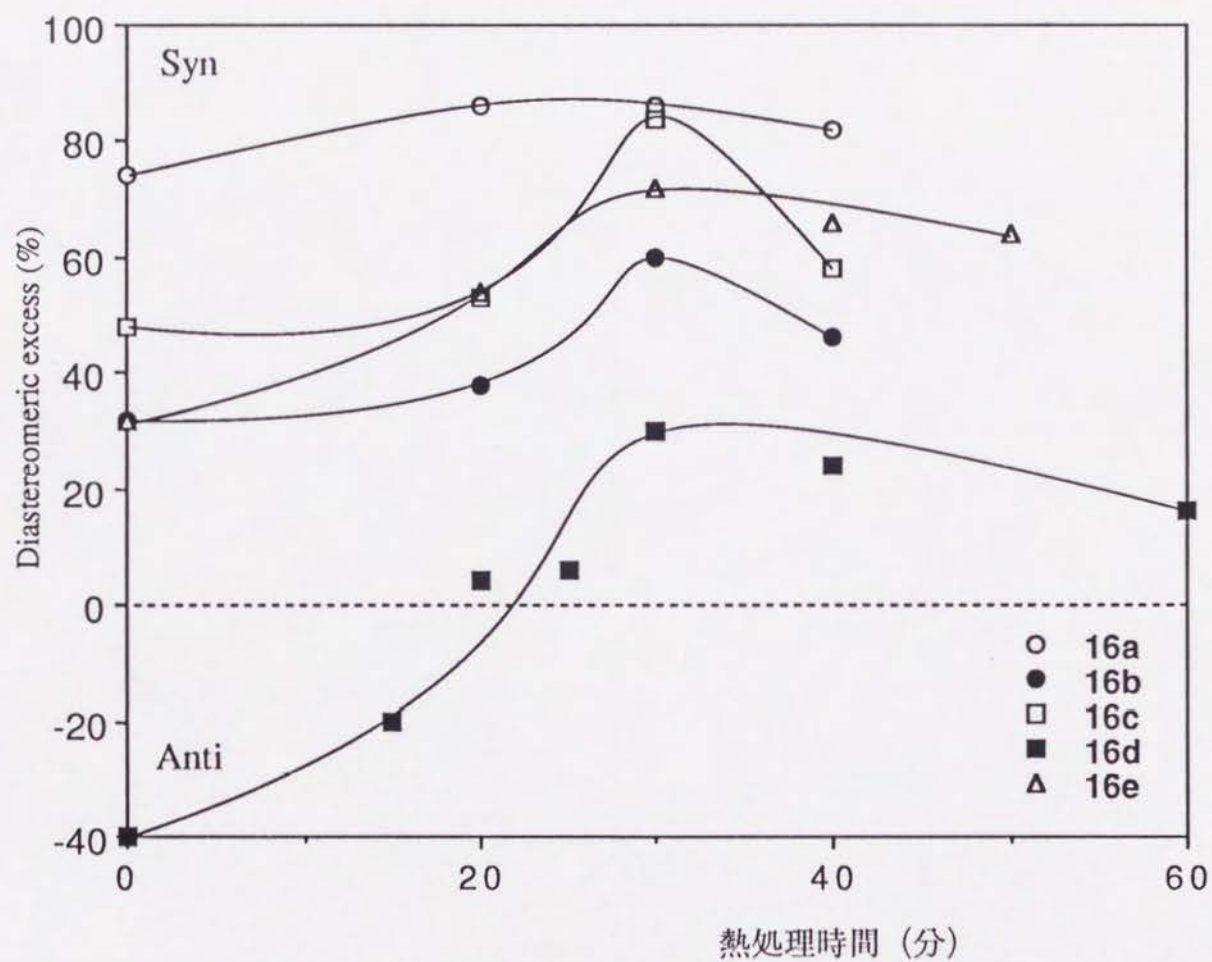


図3-4 α -置換- β -ケトエステル (16) の還元におけるパン酵母の熱処理時間の効果

パン酵母を熱処理するとシン体の選択性が向上している事がわかる。熱処理していない場合にアンチ体を与える**16d**でさえ、20分以上熱処理する事によってシン体を与えるようになる。しかし30分以上熱処理を続けると、逆に選択性が低下していくという傾向がみられる。何れの基質においても50℃で30分熱処理した場合が一番選択性が良く、それぞれ86、60、84、30、そして72%のd.e.で相当するヒドロキシエステル**31a-e**が得られた。また熱処理時間が30分程度では活性に若干の低下が見られるが、大きな反応性の低下は観測されていない。

以上、パン酵母を50℃で熱処理する事によって反応の立体選択性を制御し、シン選択的な還元反応を行う事に成功したが、この方法もやはり単独で不斉合成反応の手段とするにはまだまだ選択性は低いと言わざるを得ない。また、パン酵母を熱処理する事によってシン体の選択性が向上した事から、アンチ体を生成する酵素の方がシン体を生成する酵素に比べると熱的に不安定であると考えられる。この方法の詳細な反応機構については第4章で述べる。

3.2.3 添加剤存在下における熱処理パン酵母による還元

前項の3.2.1および3.2.2で開発した二種類の立体選択性の制御方法は、何れもシン体の選択性を向上させる方法であることから、この二種類の方法を同時に行えばさらにシン体の選択性が向上するのではないかと考え、熱処理とメチルビニルケトンの添加の両方を同時に行いその効果について検討した。実験は、まずパン酵母に種々の濃度でメチルビニルケトンを添加し、さらに50℃で30分熱処理した後基質**16d**を加え反応を行った(図3-5)。添加するメチルビニルケトンの濃度を増やしていくと、反応のジアステレオ選択性は向上し60 mMで92% d.e.にまで改善された。しかし、それ以上濃度を増やしても選択性は改善されなかった。一方、反応の変換率はメチルビニルケトンの濃度が60 mMまでは90%以上であるが、それを超えると急に活性が低下してしまう。従って最も良い結果を与えた60 mMの濃度を用いて**16a-e**の基質を還元したところ、それぞれ94、84、86、92、そして88%のd.e.で対応するシン体のヒドロキシエステル**31a-e**が得られた(表3-3)。

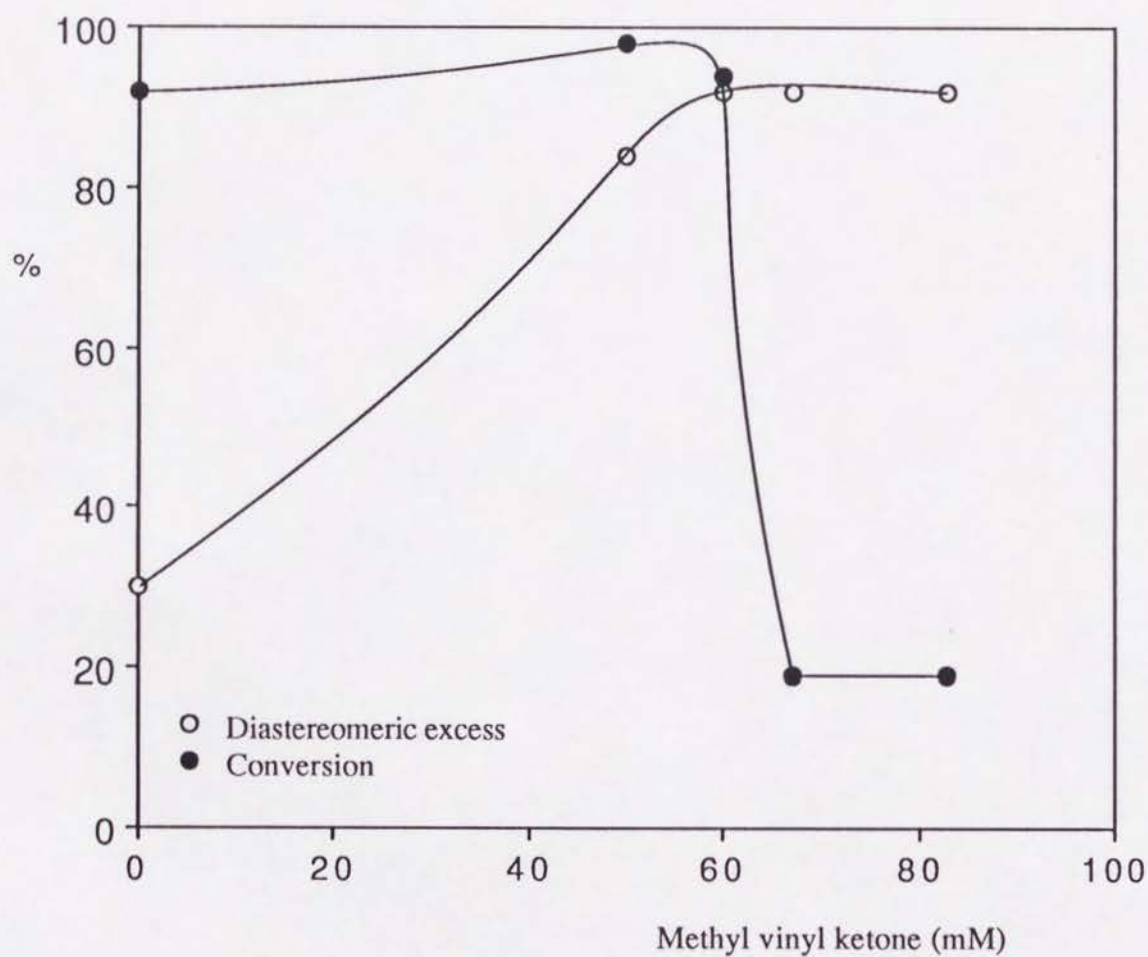


図3-5 熱処理パン酵母による2-アリル-3-オキソブタン酸エチル (16d) の還元におけるメチルビニルケトンの添加量の効果

表3-3 熱処理パン酵母による α -置換- β -ケトエステル (**16**) の還元におけるメチルビニルケトンの添加量の効果

基質	MVK濃度, mM	Syn / Anti	変換率, %
16 a	0	93 / 7	92
	60	97 / 3	94
16 b	0	80 / 20	91
	60	92 / 8	79
16 c	0	92 / 8	71
	60	93 / 7	70
16 d	0	65 / 35	92
	50	92 / 8	98
	60	96 / 4	94
	67	96 / 4	19
	83	96 / 4	19
16 e	0	86 / 14	99
	60	94 / 6	99

反応条件：**16**, 1 mmol; 水, 60 ml; 乾燥パン酵母, 20 g; 熱処理, 30℃ 30分

以上、パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステルの不斉還元について二種類の立体制御法を見だし、エナンチオかつジアステレオ選択的な還元反応を開発した。この反応はパン酵母を用いその反応条件を変えるだけで一度に2点の不斉中心を有する α -アルキル- β -ヒドロキシエステルが簡便に合成できることから、不斉合成反応の手段として非常に有効であると考えられる(図3-6)。

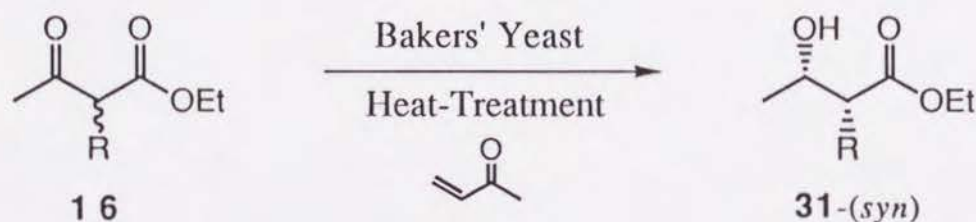


図3-6 パン酵母による(2*R*,3*S*)-*syn*-2-アルキル-3-ヒドロキシエステルの合成

3.3 実験の部

測定機器

2.3 実験の部に記述した通りである。

試薬

α -アルキル- β -ケトエステル**16b-e**の合成は文献記載の通りに行った⁹⁶。一例を合成の部に示す。その他の種々の試薬は市販のものを精製せずに使用した。

2-エチル-3-オキソブタン酸エチル**16b**の合成

3-オキソブタン酸エチル0.1 molと1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデセン-7 0.1 molを乾燥したベンゼン200 mlに溶かし、そこへヨウ化エチル0.1 molのベンゼン溶液100 mlを滴下する。室温で3時間かき混ぜた後、この反応溶液をろ過する。ろ液を水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に

濃縮した。濃縮残渣を減圧下に蒸留し(85℃/17 mmHg)、2-エチル-3-オキソブタン酸エチル**16b**を50%の収率で得た。その他の α -置換- β -ケトエステル**16c-e**についても同様の方法で合成した。

熱処理した乾燥パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)の還元
乾燥パン酵母4 gを水20 mlに懸濁させ、50℃で熱処理する。熱処理終了後、懸濁液を30℃にし、 α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)を1 mmol加え1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル20 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステル(**31**)を得た。収率は60%程度である。

メチルビニルケトンで処理した乾燥パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)の還元

乾燥パン酵母20 gを水60 mlに懸濁させ、メチルビニルケトンを加え30℃で1時間かき混ぜる。その後 α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)を1 mmolとグルコース4 gを加え30℃で1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 10 gと酢酸エチル60 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製分取し、対応する β -ヒドロキシエステル(**31**)を得た。収率は60%程度である。

熱とメチルビニルケトンで処理した乾燥パン酵母による α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)の還元

乾燥パン酵母20 gを水60 mlに懸濁させ50℃にし、メチルビニルケトンを加え30分熱処理する。熱処理終了後懸濁液を30℃にし、 α -アルキル- β -ケトエステル(**16**)を1 mmol加え1日かき混ぜる。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 10 gと酢酸エチル60 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製分取し、対応

する β -ヒドロキシエステル (31) を得た。収率は50 - 60%程度である。

α -アルキル- β -ヒドロキシエステル (31) のMTPAエステルの合成

アルゴンガス雰囲気下、乾燥ベンゼン1 mlに α -アルキル- β -ヒドロキシエステル (31) を0.03 mmolと乾燥ピリジン1.5 mmol、および(R)-(+)- α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル) フェニル酢酸クロリド (MTPACl) 0.2 mmolを加え室温で一晩かき混ぜる。反応終了後、酢酸エチルと水を加え抽出する。有機層を1 M塩酸、飽和炭酸ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、減圧下で濃縮し対応するMTPAエステルを得る。収率は90%以上である。

α -アルキル- β -ヒドロキシエステル (31) の不斉収率の決定

ヒドロキシエステル (31) を対応するMTPAエステルに変換し、そのキャピラリーガスクロマトグラムの面積比から不斉収率を決定した。クロマトグラムの例を図3-7に示す。

α -アルキル- β -ヒドロキシエステル (31) のジアステレオマー比 (Syn/Anti)の決定

得られた α -アルキル- β -ヒドロキシエステル (31) のキャピラリーガスクロマトグラム(PEG-20M, 25m)の面積比によって決定した³⁹¹。クロマトグラムの例を図3-8に示す。

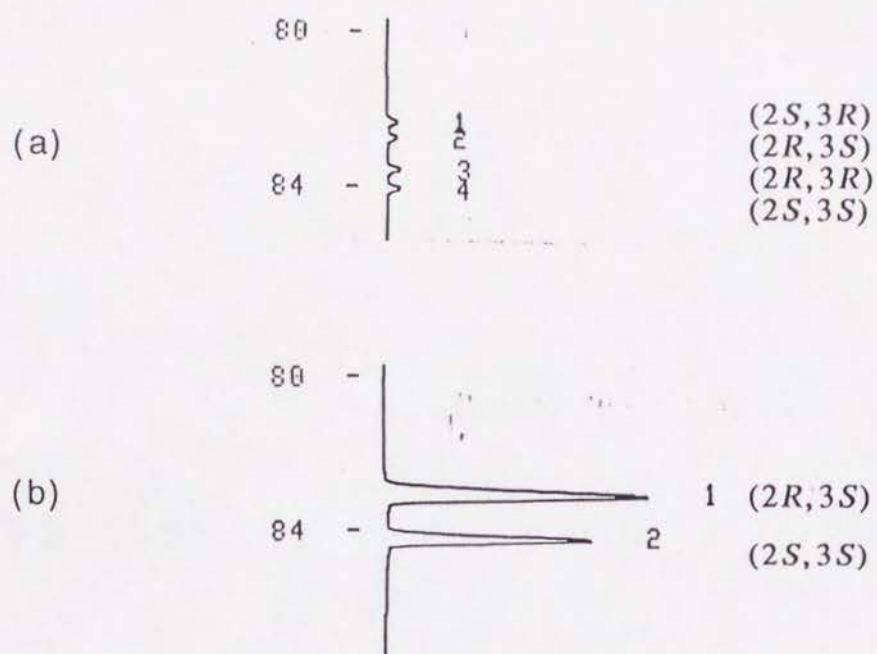


図3-7 2-アリル-3-ヒドロキシブタン酸エチル (**31d**) のMIPAエステルのガスクロマトグラム
(a) NaBH_4 還元生成物 (b) パン酵母還元生成物

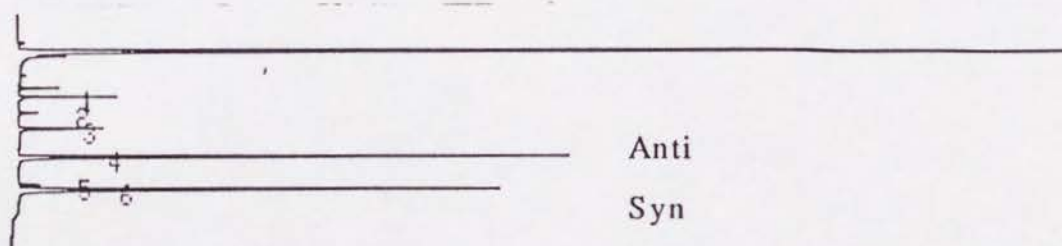


図3-8 2-アリル-3-ヒドロキシブタン酸エチル (**31d**) のガスクロマトグラム

第4章 パン酵母による不斉還元における立体制御の機構

4.1 序論

第2章および第3章に述べたように、パン酵母による種々の β -ケトエステルの不斉還元の立体選択性の制御に関して種々の方法を開発した。 β -ケトエステルの不斉還元では、パン酵母をグルコースやメチルビニルケトンで処理するとD体のヒドロキシエステルが、クロロ酢酸エチルや塩化マグネシウムで処理するとL体のヒドロキシエステルがそれぞれ選択的に得られる事を明らかにした。また、 α -アルキル- β -ケトエステルの不斉還元では、パン酵母を熱処理し更にメチルビニルケトンで処理する事によって、(2R,3S)-*syn*-ヒドロキシエステルが選択的に合成できる事を明らかにした。これらの方法は全て「反応に関与する酵素が複数存在しているために選択性が悪い。」という仮定のもとに開発してきた方法である。即ち、多数の酵素の中でそれぞれの酵素反応は選択的であるが、相反する選択性を有する酵素が存在し反応に関与しているために、結果的に反応の選択性が悪くなるという仮定である。この仮定のもとに、開発した種々のパン酵母の処理方法によって、特定の酵素反応を活性化または阻害することができたために反応の選択性が制御できたものと考えてきた。

実際、パン酵母によるケトエステルの還元が複数の酵素によって進行している事を明らかにした報告が幾つかある。2.1で述べた様に、Shiehらは³⁷⁵パン酵母中から4-クロロ-3-オキソブタン酸エステルを還元する酵素を三種類単離し、D酵素が二種類とL酵素が一種類存在する事を報告している。また、Heidlasらは³⁹²3-オキソブタン酸エチルを還元する酵素はパン酵母中に二種類あり、それぞれがD酵素とL酵素である事を明らかにしている。一方、古市らは2-メチル-3-オキソブタン酸ベンジルを還元する酵素をパン酵母から³⁷⁹、また2-メチル-3-オキソコハク酸ジエチルを還元する酵素を*Saccharomyces fermentati*から³⁸⁰それぞれ一種類だけ単離しているが、これら単離された酵素の立体選択性は菌体を用いて反応を行ったときの立体選択性と大きく異なる事から、これらの反応も他の酵素が存在し、菌体内では複数の酵素が関与している可能性が強い。

この章では、パン酵母によるケトンの不斉還元について、これまでに開発してきた全ての立体制御法の詳細を明確にするために、パン酵母中から β -ケトエステルの還元酵素を単離して反応機構を検討した結果について述べる。すなわち、それぞれの酵素反応の速度論と立体化学的性質について研究し、各々の立体制御法の詳細な反応機構について議論する。

4.2 本論

4.2.1 酸化還元酵素の単離

ダイノミルを用いてパン酵母1 kgの細胞膜を破碎し、遠心分離する事によって上澄みの酵素溶液を得た。この酵素溶液を陰イオン交換カラム(DEAE-Toyopearl)を用いて核酸などを除き、再び陰イオン交換カラムクロマトグラフィー(DEAE-Toyopearl)を行う事によって4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル(12b)に還元活性のある4種類の酵素を得た。クロマトグラムを図4-1に示す。これら全ての酵素はNADPHを補酵素とする酵素である。これら四種類の酵素は更に図4-2に示した方法で精製を行った。L-酵素-1は疎水クロマトカラム(Butyl-Toyopearl)、陰イオン交換クロマトカラム(PEI)、陽イオン交換クロマトカラム(CE)、およびゲルろ過クロマトカラム(Cellulofine)によって精製した。L-酵素-2は疎水クロマトカラム(Butyl-Toyopearl)、陰イオン交換クロマトカラム(PEI)、疎水クロマトカラム(HIC)、およびゲルろ過クロマトカラム(Cellulofine)によって精製した。そしてD-酵素-1とD-酵素-2はそれぞれ疎水クロマトカラム(Butyl-Toyopearl)によって精製した。

得られた各酵素の全活性量と立体選択性は、4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル(12b)の還元反応により決定したものである(表4-1)。ただし、L-酵素-2についてはこの酵素が室温で不安定なために、還元反応の生成物が得られなかった。そこで、酵素を安定化するために反応系に牛血清アルブミン(BSA)を添加して酵素の安定性を検討したところ、30℃で1時間後でも活性を保持していることを見いだしたので、L-酵素-2に関しては牛血清アルブミンを反応の際に添加して還元を行った(図4-3)。この結果から、四種類全ての酵素が立体選択的に β -ケトエステルを還元し、その内の二種類がL体生成物を与えるL-酵素であり、他の二種類はD体生成物を与えるD-酵素であることが明らかに

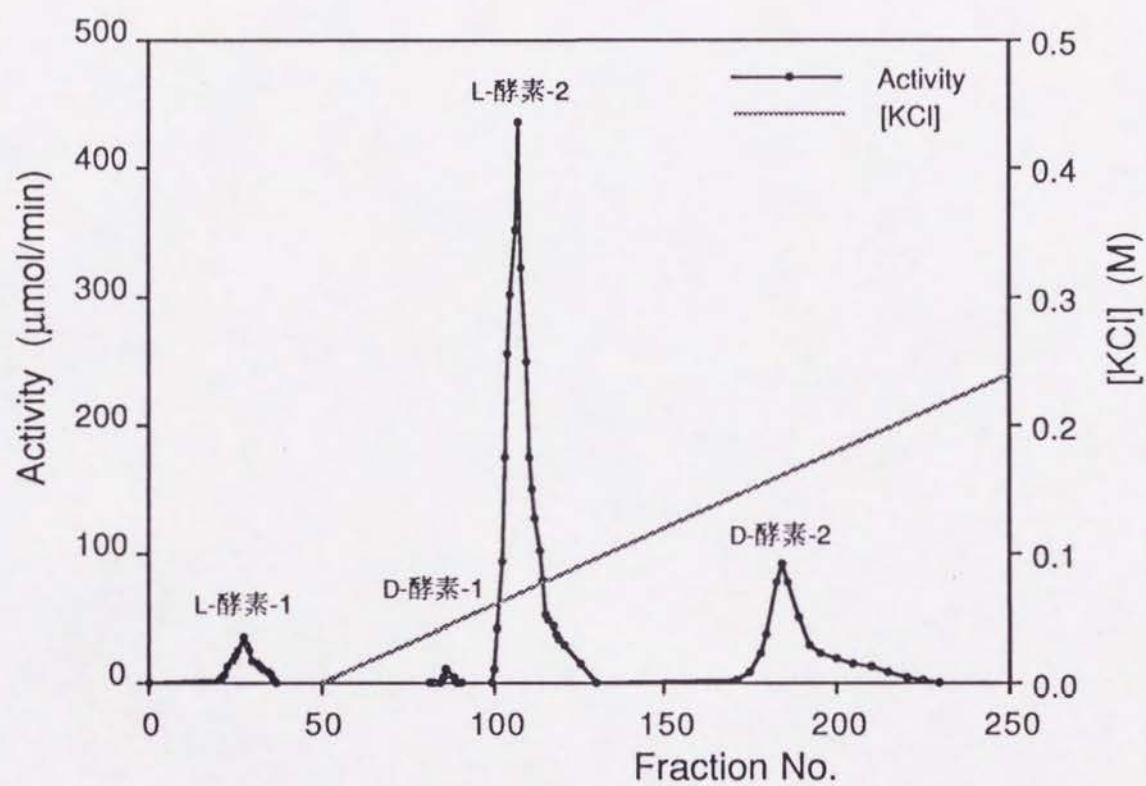


図4-1 DEAE-Toyopearl による還元酵素のクロマトグラム

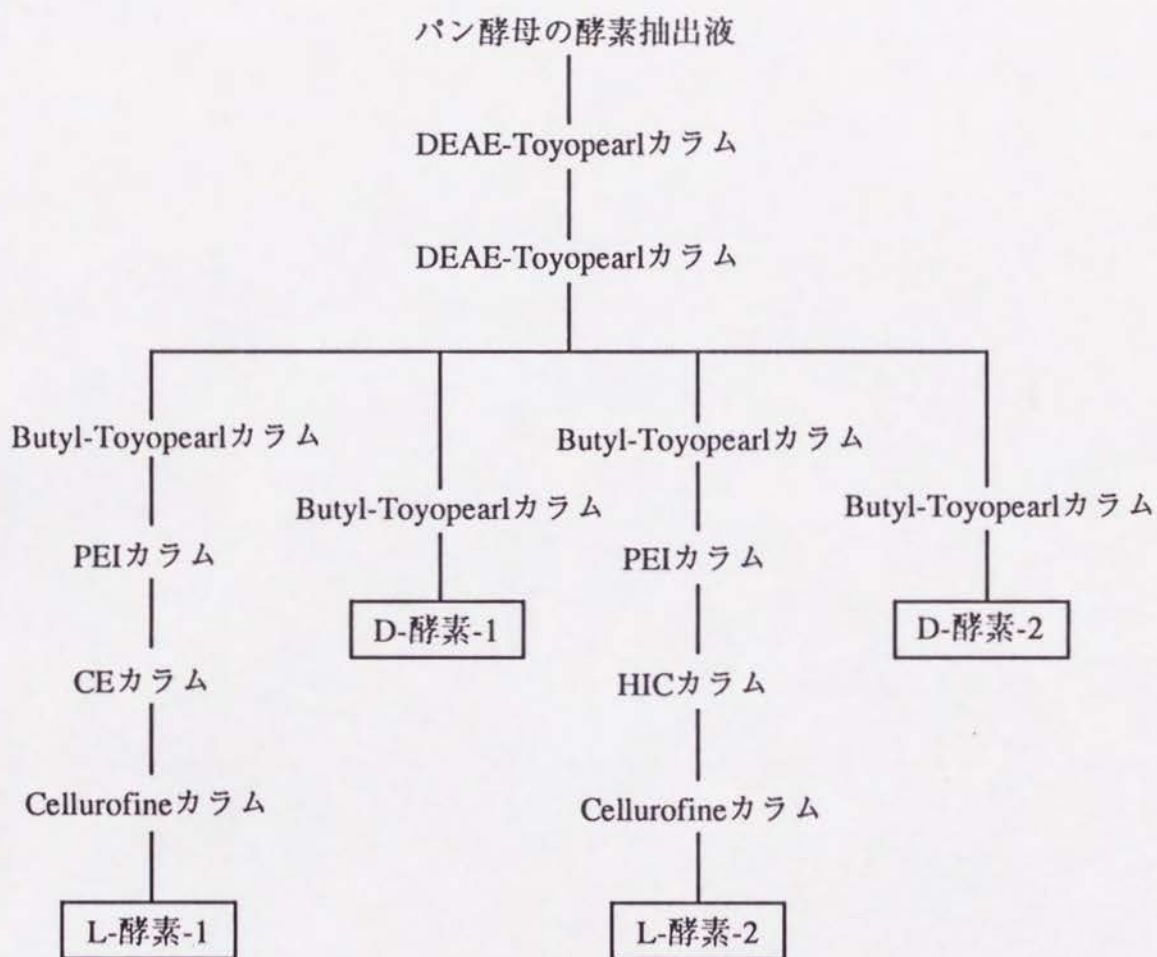


図4-2 還元酵素の精製および単離

表4-1 還元酵素による4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル (12b) の還元

酵素	分子量 (kDa)	全活性量 (U)	絶対配置	e.e. (%)
D-酵素-1	25	26	D	>99
D-酵素-2	1,600	1,442	D	>99
L-酵素-1	32	246	L	>99
L-酵素-2	32	3,108	L	>99

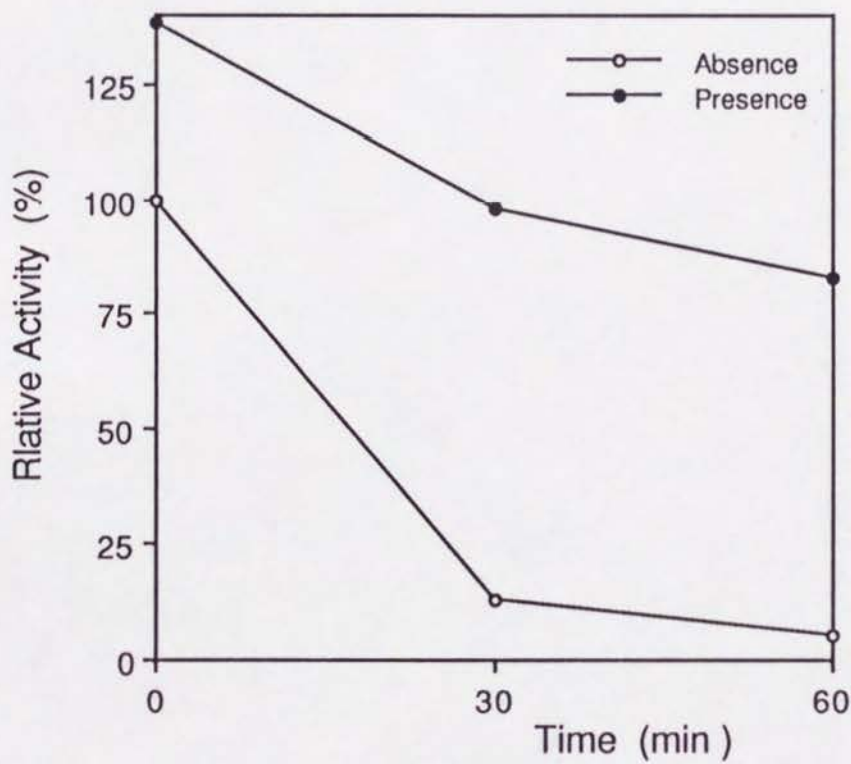
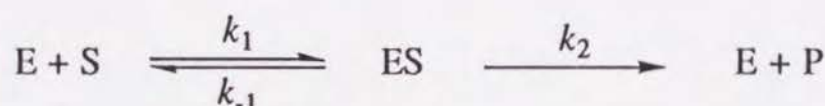


図4-3 牛血清アルブミン存在下でのL-酵素-2の安定性 (30℃)

なった。また、各酵素の分子量はゲルろ過カラムクロマトグラフィー（D-酵素-1とD-酵素-2はSuperose、L-酵素-1とL-酵素-2はAsahipak）によって決定した（表4-1）。ただしゲルろ過カラムの排除限界が300 kDaであることから、D-酵素-2について観測された分子量(1,600 kDa)には相当大きな実験誤差が含まれていると考えられる。

次に、それぞれの酵素反応の特徴を明らかにするために、種々の速度パラメーターを求めた。酵素反応を模式的に表すと、スキーム4-1^{393,394}のようになる。

スキーム 4-1



E: 酵素, S: 基質, P: 生成物

この反応スキームにおいてBriggsら³⁹⁵が行った定常状態近似法を適用すると、次のような速度パラメーターが得られる。

$$v = \frac{[E_0][S]k_2}{[S] + K_M}, \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}, \quad V_{\max} = k_2[E_0], \quad k_{\text{cat}} = k_2$$

紫外スペクトルを用いて、4-クロロ-3-オキシブタン酸エチルを基質に用いた時の各酵素の反応速度を測定・解析し、それぞれの速度パラメーターを求め表4-2に示した。またそれぞれの酵素を特徴づけるために、酵素活性の温度依存性（図4-4）、熱安定性（図4-5）、および酵素活性のpH依存性（図4-6）を調べた。

以上、パン酵母よりβ-ケトエステルに還元活性のある四種類の酸化還元酵素を単離し、それぞれの全活性量、立体選択性、速度パラメーター、分子量、および特性を明らかにした。4.1で述べたように、パン酵母中からβ-ケトエステルに還元活性のある酵素を単離した報告例が幾つかある。古市らは2-メチル-3-オキシブタン酸ベンジルに還元活性のあるL-酵素を単離している³⁷⁹。4.2.5で詳しく述べるが、今回単離した二種類のL-酵素は何れも2-メチル-3-オ

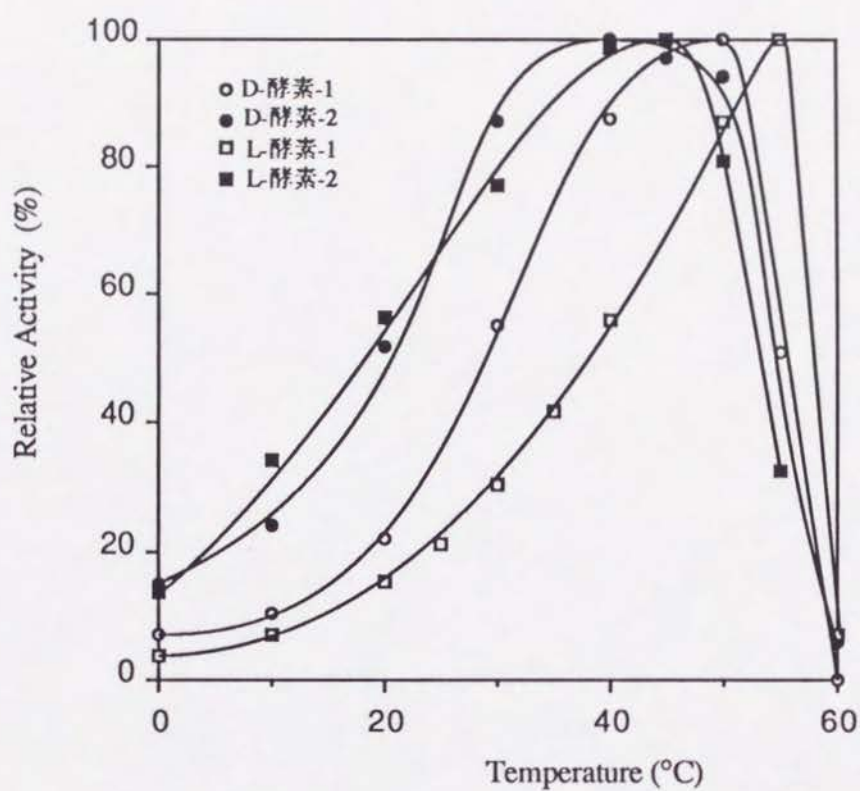


図4-4 酵素活性の温度依存性

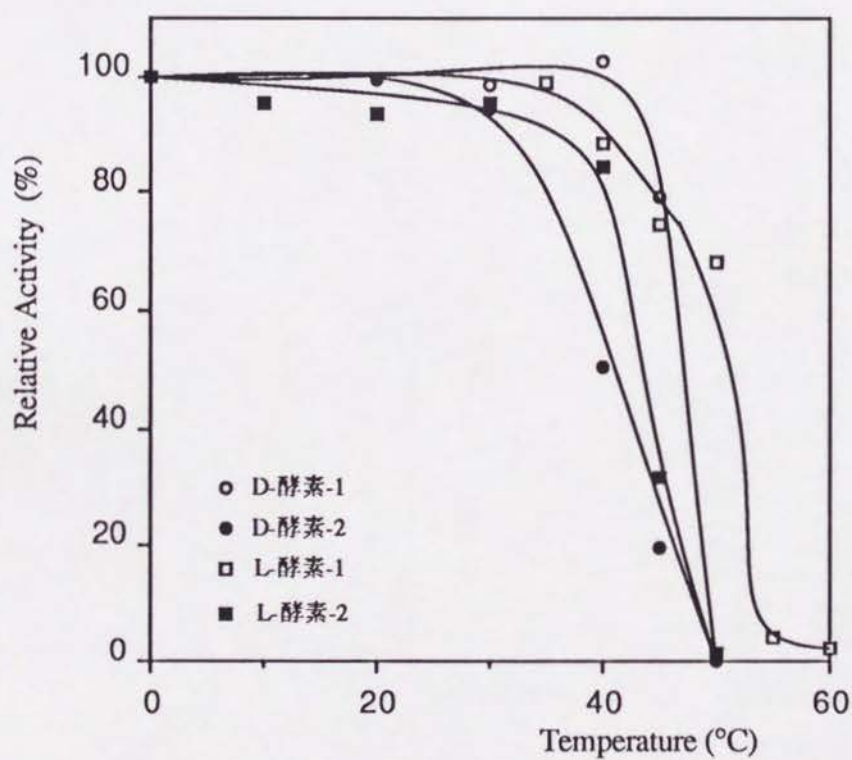


図4-5 酵素の熱安定性

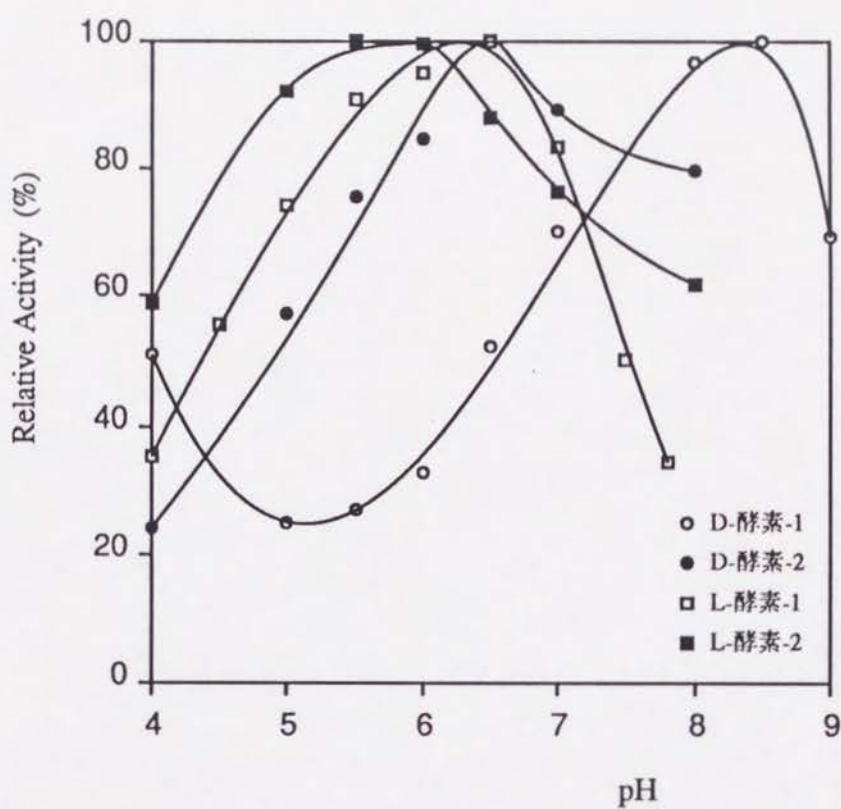


図4-6 酵素活性のpH依存性

表4-2 還元酵素の**12b**の還元における速度パラメーター

酵素	K_M (mM)	k_{cat} (s^{-1})
D-酵素-1	0.59	303 ^a
D-酵素-2	4.54	
L-酵素-1	0.13	6.20
L-酵素-2	0.15	4.66

^a 文献 375

キソブタン酸エチル (**16a**) を還元する事ができるが、古市らのL-酵素はこの基質を還元できない事から両者は違う酵素であると考えられる。また、Shiehらは種々の4-クロロ-3-オキシブタン酸エステルに還元活性のある酵素を三種類単離している³⁷⁵。その中でShiehらが脂肪酸合成酵素(FAS)であろうと報告しているD-酵素は、立体選択性、分子量、および速度パラメーターが非常に近い事から、今回単離したD-酵素-2と同じであると考えられる。また、Shiehらの報告しているもう一方のD-酵素も今回単離したD-酵素-1と近い性質を示している。しかし、彼らが報告しているL-酵素は分子量と速度パラメーターが今回単離した何れのL-酵素とも大きく異なっている。Heidlasらは**12c**を還元する酵素を二種類単離している³⁹²。そして、そのうちのD-酵素は脂肪酸合成酵素であろうと報告している。しかし、彼らのもう一方のL-酵素は今回単離した二種類のL-酵素や、Shiehらが単離したL-酵素とは分子量が異なっている。このような違いが生じる原因としては、パン酵母の由来が異なる等の原因が考えられるが、詳しい事についてはまだわかっていない。そして、これまでに報告されてきた β -ケトエステルに還元活性のある種々の酸化還元酵素に関しては、脂肪酸合成酵素を除いてその生体基質はまだ明らかになっていない。

次項で、これらの酵素を用いて種々の添加剤が及ぼす影響について詳しく検討した結果を述べるが、表4-1よりD-酵素-1に関してはその全活性量が全体の活性量の0.5%と非常に少ない事から、パン酵母による β -ケトエステルの還元は殆どこれ以外の三種類の酵素によって進行していると考えてよいだろう。従って以後の速度論的な検討は主にD-酵素-1、L-酵素-1、およびL-酵素-2の三種類の酵素について行う事にした。

4.2.2 不飽和ケトンを添加した際の反応機構

パン酵母を用いて β -ケトエステルを還元すると、一般的にエナンチオ選択性は低い。そこへメチルビニルケトンのような α, β -不飽和ケトンを添加すると、D体のヒドロキシエステルが選択的に得られる事から、これらの添加剤が特定の酵素に特異的に作用していると考えられる。そこでこの反応の機構を詳細に検討するために、4-クロロ-3-オキシブタン酸エチル (**12b**) を基質として、メチルビニルケトンの濃度を変化させて酵素活性を測定した。それぞ

れの酵素についてのDixonプロット（ $1/v$ - $[I]$ プロット）およびLineweaver-Burkプロット（ $1/v$ - $1/[S]$ プロット）を図4-7～4-12に示す。またDixonプロットから得られた阻害定数(K_i)および阻害様式を表4-3に示す。

非拮抗型阻害剤が存在する場合、その相対速度は式(4-1)であらわす事ができる³⁹⁶。

$$\text{Relative Rate} = K_i / (K_i + [I]) \tag{4-1}$$

実際の還元反応の条件下ではメチルビニルケトンの濃度が50 mMであるから、それぞれの酵素の相対活性は式(4-1)よりD-酵素-2が0.75、L-酵素-1が0.50、そしてL-酵素-2は0.11となる。D-酵素とL-酵素の全活性量で比較をした場合、D-酵素は75%の活性を保持しているが、L-酵素は14%の活性しか残っていない事になる。

以上の結果から反応系にメチルビニルケトンを加えた場合の反応機構は、図4-13の様に結論付けられる。すなわち、両方のL-酵素の反応はメチルビニルケトンによって強く阻害され、反応は主にD-酵素-2によって進行するためにD体のβ-ヒドロキシエステルが選択的に得られたわけである。

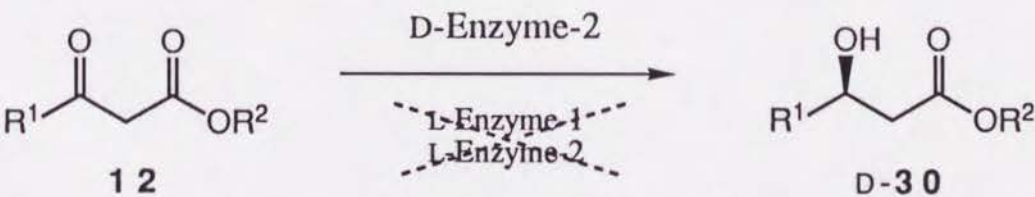


図4-13 メチルビニルケトンを添加した際の反応機構

表4-3 メチルビニルケトンによる酵素の阻害様式と阻害定数

酵素	K_i (mM)	阻害様式
D-酵素-2	154	非拮抗型阻害
L-酵素-1	50.6	非拮抗型阻害
L-酵素-2	6.38	非可逆型阻害

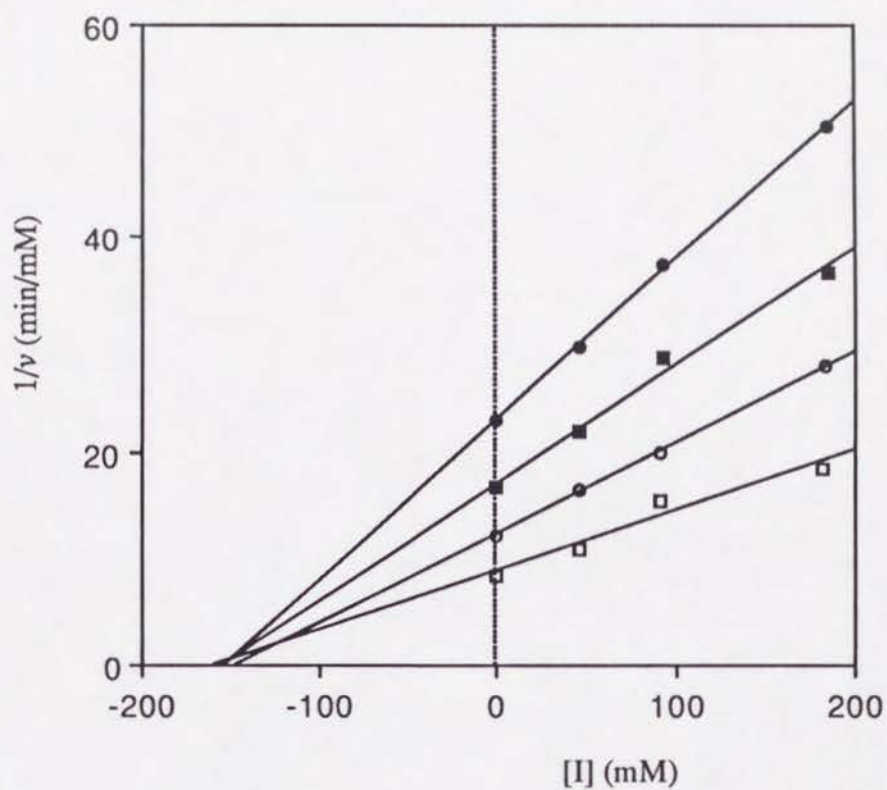


図4-7 D-酵素-2のDixonプロット

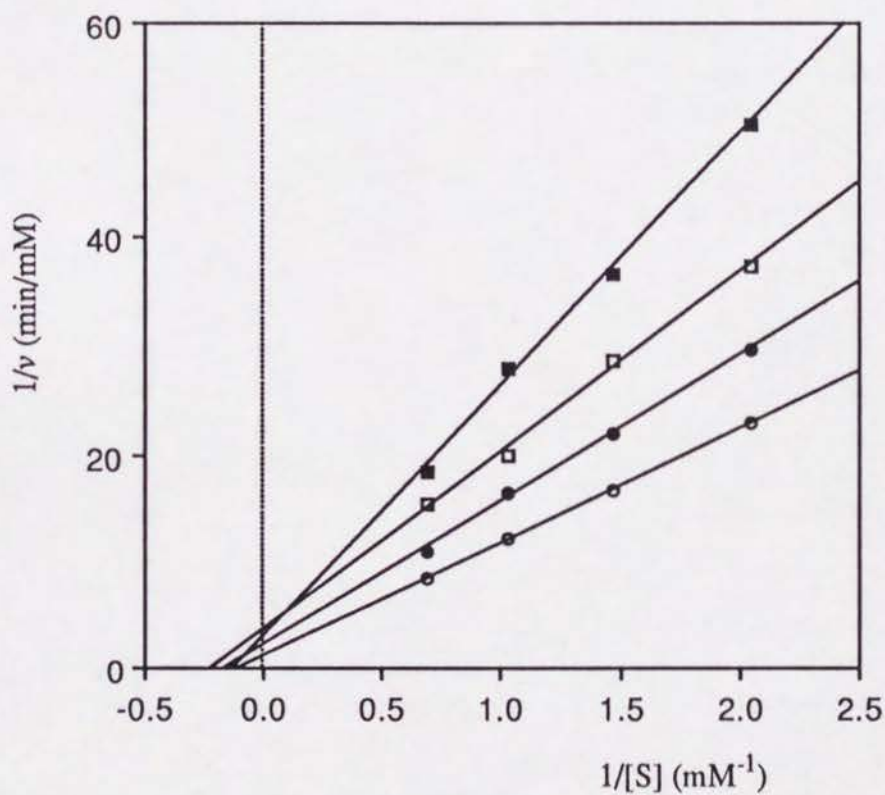


図4-8 D-酵素-2のLineweaver-Burkプロット

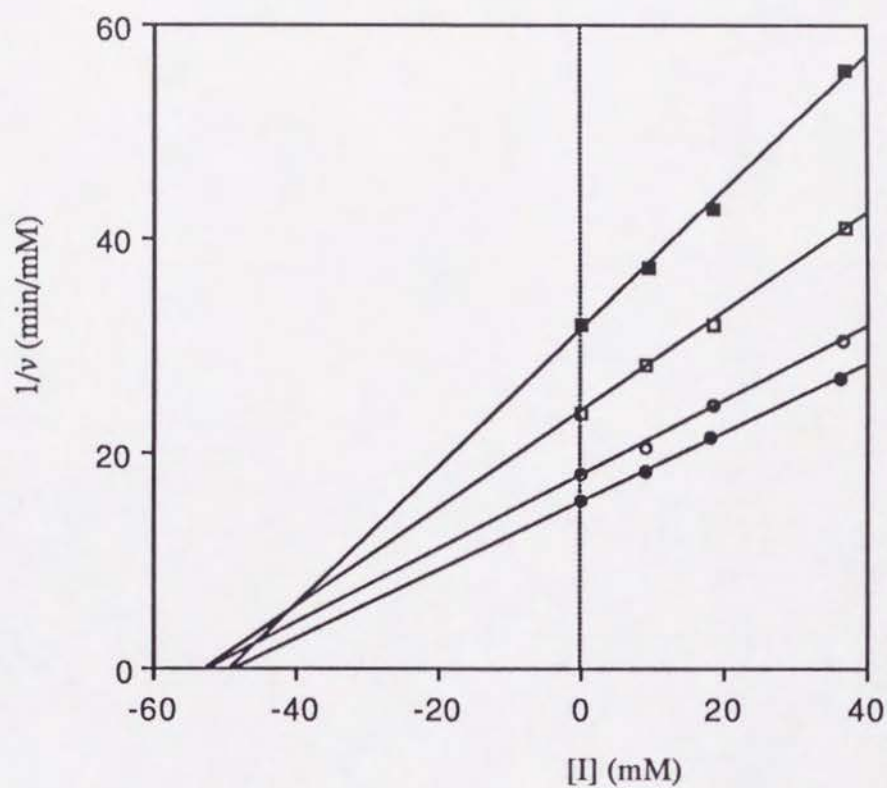


図4-9 L-酵素-1のDixonプロット

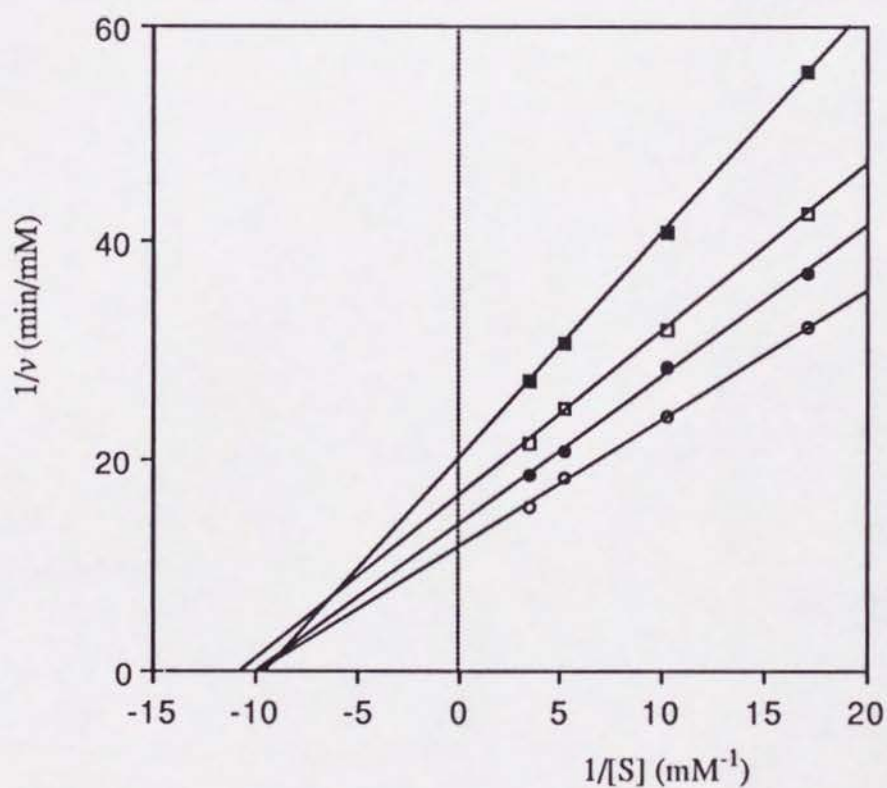


図4-10 L-酵素-1のLineweaver-Burkプロット

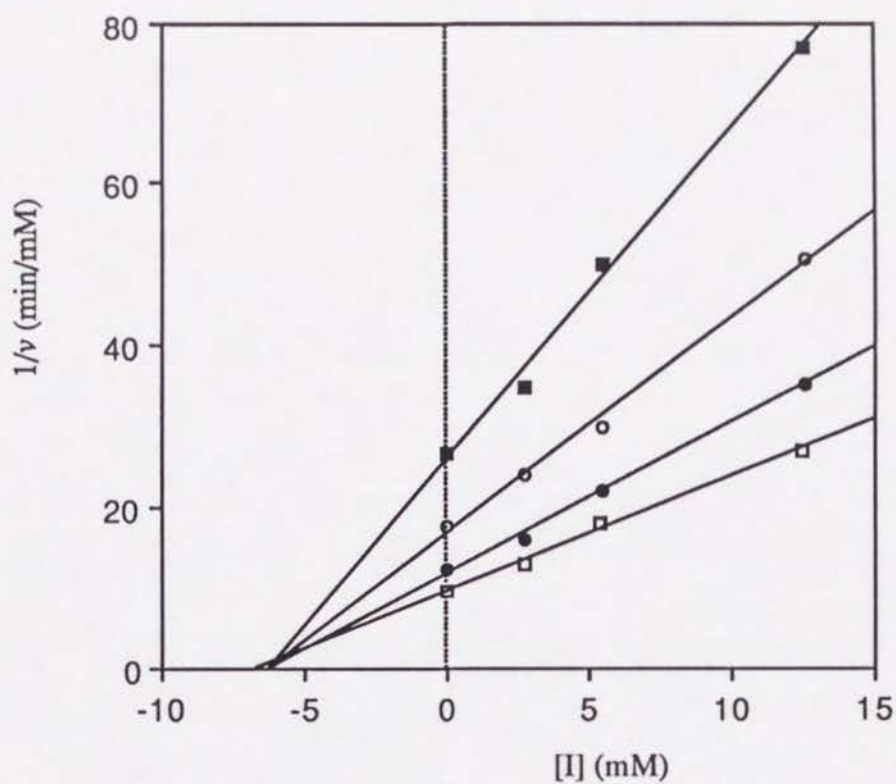


図4-11 L-酵素-2のDixonプロット

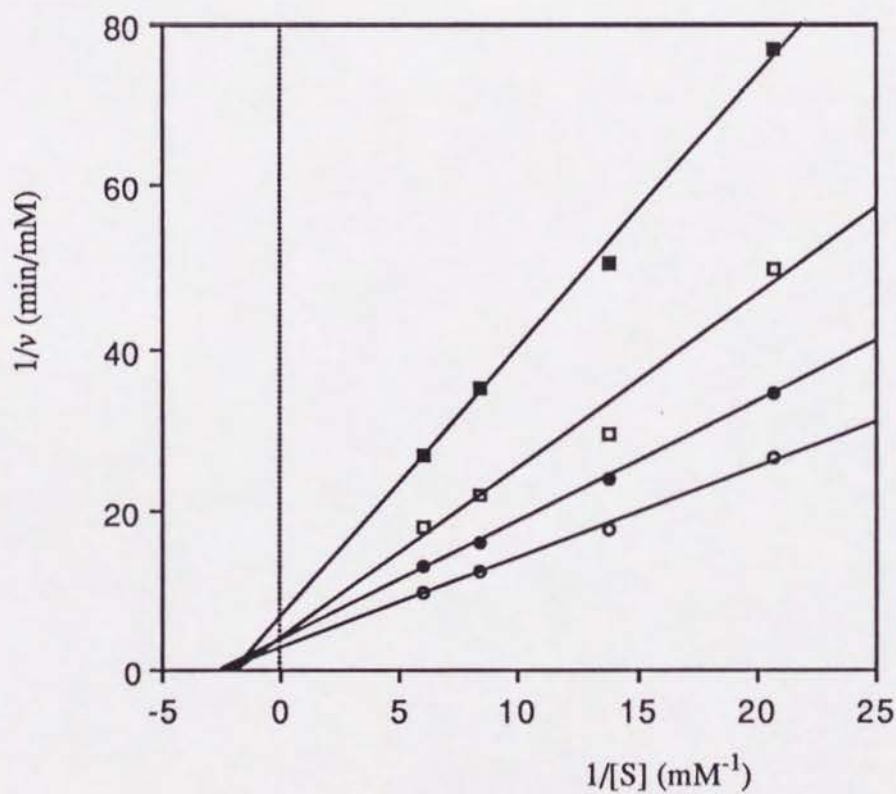


図4-12 L-酵素-2のLineweaver-Burkプロット

4.2.3 ハロエステルを添加した際の反応機構

パン酵母還元の際にクロロ酢酸エチルを反応系に添加した場合はL体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られる。この反応機構を詳しく調べるために、4.2.2と同様に**12b**を基質として、クロロ酢酸エチルの濃度を種々変化させて酵素活性を測定した。それぞれの酵素についてのDixonプロット ($1/v$ -[I]プロット) およびLineweaver-Burkプロット ($1/v$ - $1/[S]$ プロット) を図4-14~4-17に示す。またDixonプロットから得られた阻害定数(K_i)および阻害様式を表4-4に示す。ただしL-酵素-1については、クロロ酢酸エチルの飽和濃度である150 mMでも殆ど阻害作用が観測されなかったために、各種のプロット及び阻害定数は得られなかった。表4-4から、クロロ酢酸エチルを添加した場合もメチルビニルケトンを追加した場合と同様に、L-酵素-2が最も阻害されやすい事がわかる。しかしD-酵素-2も同時に阻害されている事から、クロロ酢酸エチルを添加した際の反応機構は、L-酵素-1によって反応が進行しL体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られたものである(図4-18)。

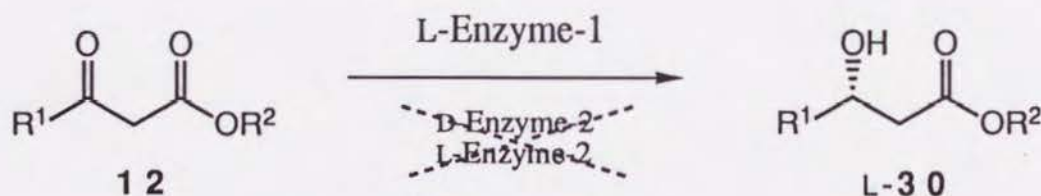


図4-18 クロロ酢酸エチルを添加した際の反応機構

表4-4 クロロ酢酸エチルによる酵素の阻害様式と阻害定数

酵素	K_i (mM)	阻害様式
D-酵素-2	89.2	非拮抗型阻害
L-酵素-1	very large	
L-酵素-2	4.42	混合型阻害

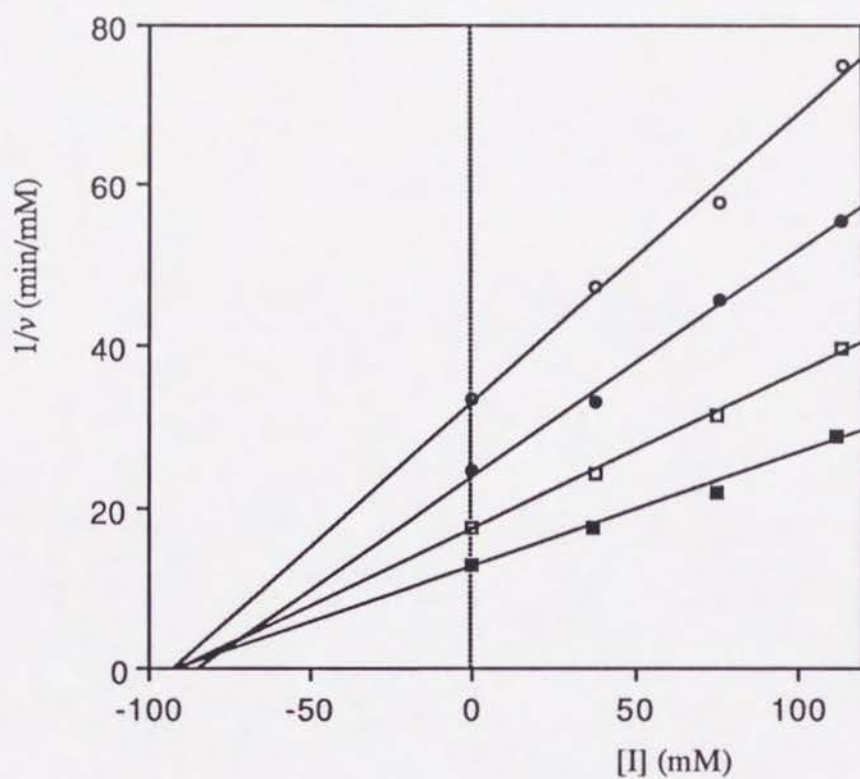


図4-14 D-酵素-2のDixonプロット

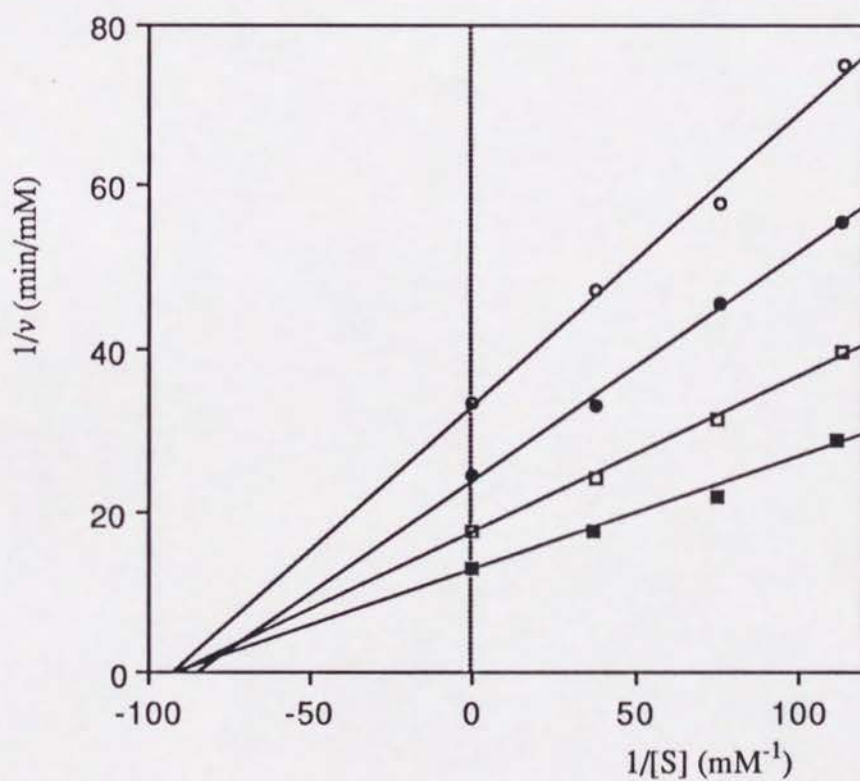


図4-15 D-酵素-2のLineweaver-Burkプロット

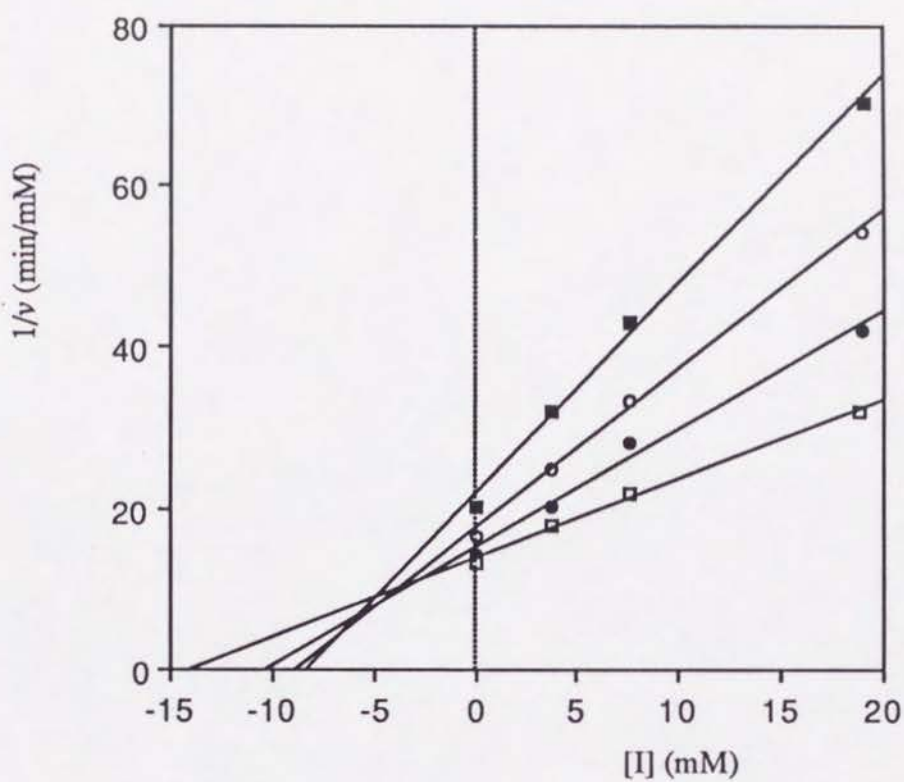


図4-16 L-酵素-2のDixonプロット

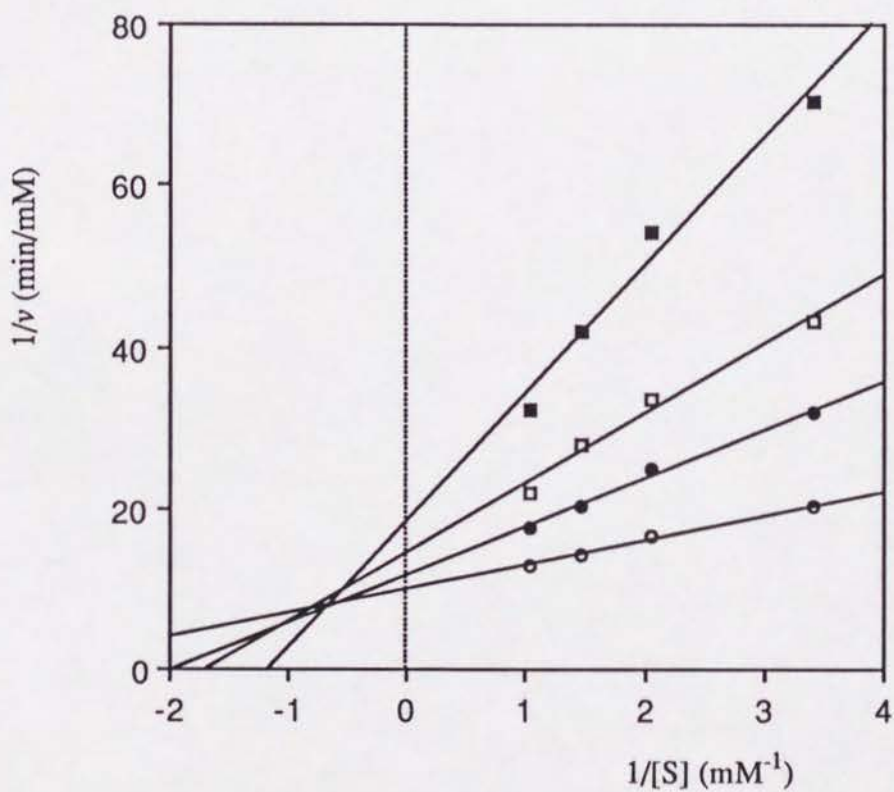


図4-17 L-酵素-2のLineweaver-Burkプロット

4.2.4 塩類を添加した際の反応機構

塩化マグネシウムを反応系に添加すると、クロロ酢酸エチルの場合と同様にL体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られる。この反応機構を調べるために、**12b**を基質として塩化マグネシウムの濃度を種々変化させて酵素活性を測定した。それぞれの酵素のDixonプロット ($1/v$ - $[I]$ プロット) を図4-20に示す。しかし、図4-20に見られるように、この反応の速度の逆数と塩化マグネシウムの濃度に直線関係が成り立っていない事から、阻害定数(K_i)は算出できなかった。阻害の効果を見積もるために相対速度と塩化マグネシウムの濃度をグラフにし図4-21に示す。併せて、相対速度の対数と塩化マグネシウムの濃度もグラフにし図4-22に示す。図4-22において相対速度の対数と塩化マグネシウムの濃度に直線関係が得られる事から、グラフより I_{50} を求め表4-5にまとめた。この表より塩化マグネシウムを加えた場合はD-酵素-2が最も阻害されやすい事がわかり、この反応はL-酵素-1及びL-酵素-2によって進行しL体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られたと説明できる (図4-19)。

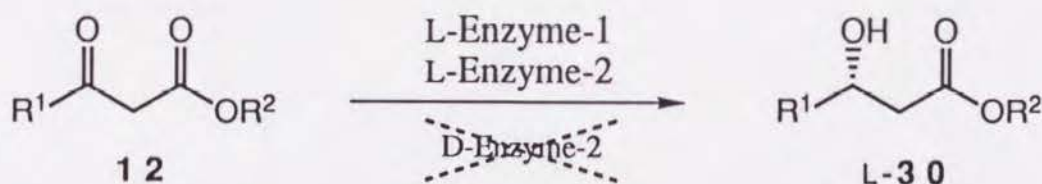


図4-19 塩化マグネシウムを添加した際の反応機構

4.2.5 熱処理を行った際の反応機構

α -アルキル- β -ケトエステル (**16**) をパン酵母で還元するとL体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られる事から、パン酵母中のL-酵素のみが反応に関与していると考えられる。実際に中村らはパン酵母中より**16**に還元活性のある二種類のL-酵素を単離し、それが今回単離した二種類のL-酵素と同一である事を報告している²⁶⁵。さらに、彼らはこれらの酵素による種々の α -アルキル- β -ケトエステル (**16**) の還元立体選択性について検討し、L-酵素-1はシン体のみを与える酵素であり、L-酵素-2はシン体とアンチ体の混合物を与え

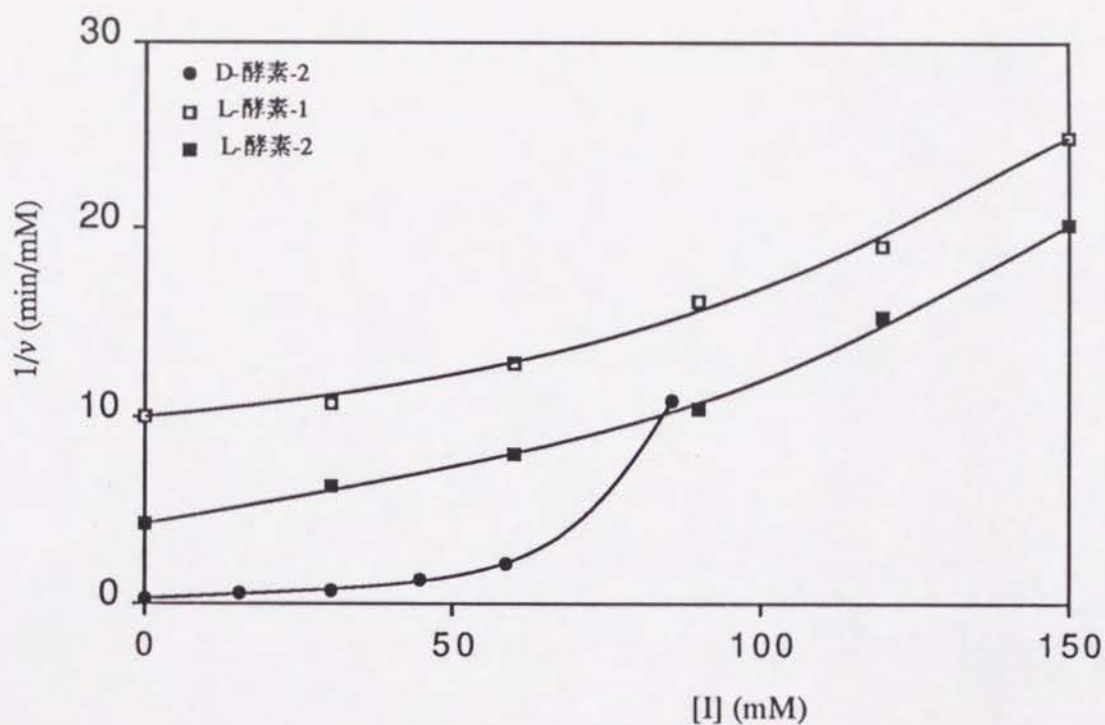


図4-20 塩化マグネシウムによる阻害のDixonプロット

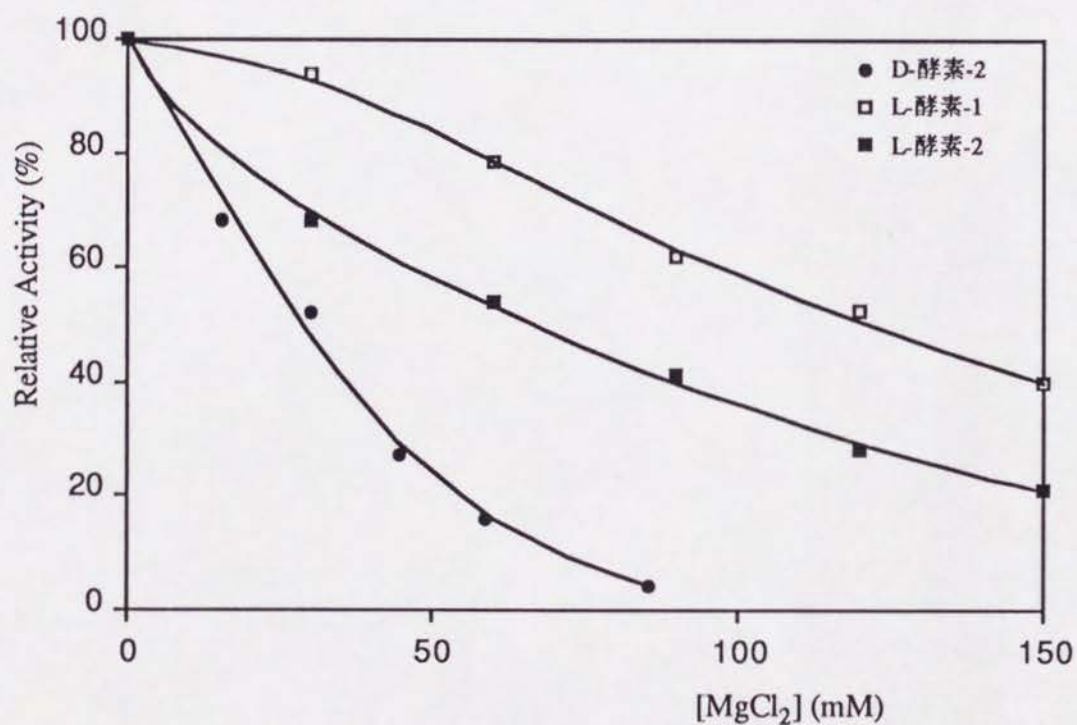


図4-21 酵素活性に及ぼす塩化マグネシウムの影響 1

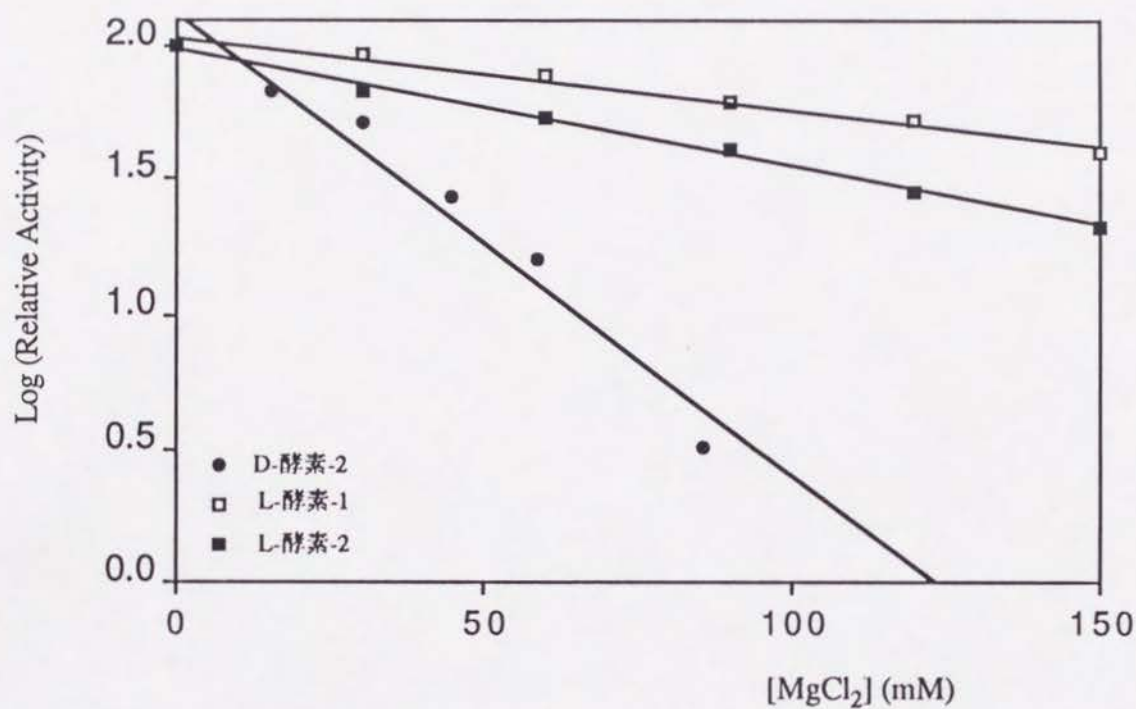


図4-22 酵素活性に及ぼす塩化マグネシウムの影響 2

表4-5 塩化マグネシウムによる酵素の阻害の阻害定数

酵素	I_{50} (mM)
D-酵素-2	24.6
L-酵素-1	123.9
L-酵素-2	66.1

る酵素である事を報告している。熱処理したパン酵母やメチルビニルケトンで処理したパン酵母による還元ではシン体の β -ヒドロキシエステルが選択的に得られる事から、反応はL-酵素-1によって進行しているものと考えてよい。

この反応の機構を詳細に検討するために、酵素の熱安定性について検討した。図4-5に示したように50℃で10分間熱処理するとL-酵素-1以外の酵素は全て失活してしまう。そこで50℃における酵素活性の経時変化について検討した。その結果を図4-23および4-24に示す。グラフよりL-酵素-2は10分でほとんど失活してしまうのに対し、L-酵素-1は81%の活性を保っている事がわかる。しかしパン酵母を50℃で30分間熱処理しただけではアンチ体の β -ヒドロキシエステル(31)が少量ではあるが生成する事から(表3-1)、L-酵素-2はパン酵母の細胞中では熱的に多少安定化されている事が示唆される。またメチルビニルケトンは表4-3に示した様に、L-酵素-2を非可逆的に、かつL-酵素-1より強く阻害している。以上の結果から、16の還元ではパン酵母を熱処理し更にメチルビニルケトンで処理する事によって、シン体とアンチ体を与えるL-酵素-2は活性を失い、シン体のみを与えるL-酵素-1によって反応が進行し、L-シン体の β -ヒドロキシエステル(31)が選択的に得られたと説明できる(図4-25)。

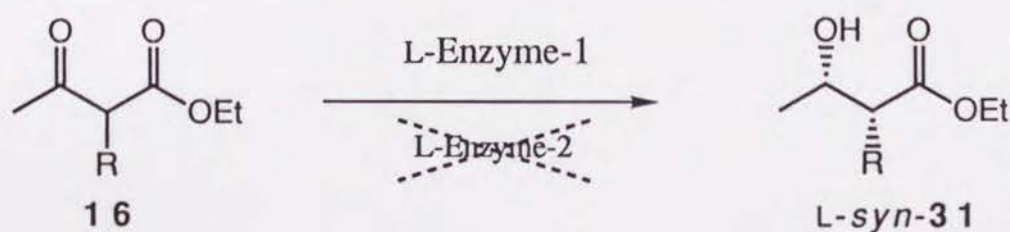


図4-25 酵母を熱処理した際の反応機構

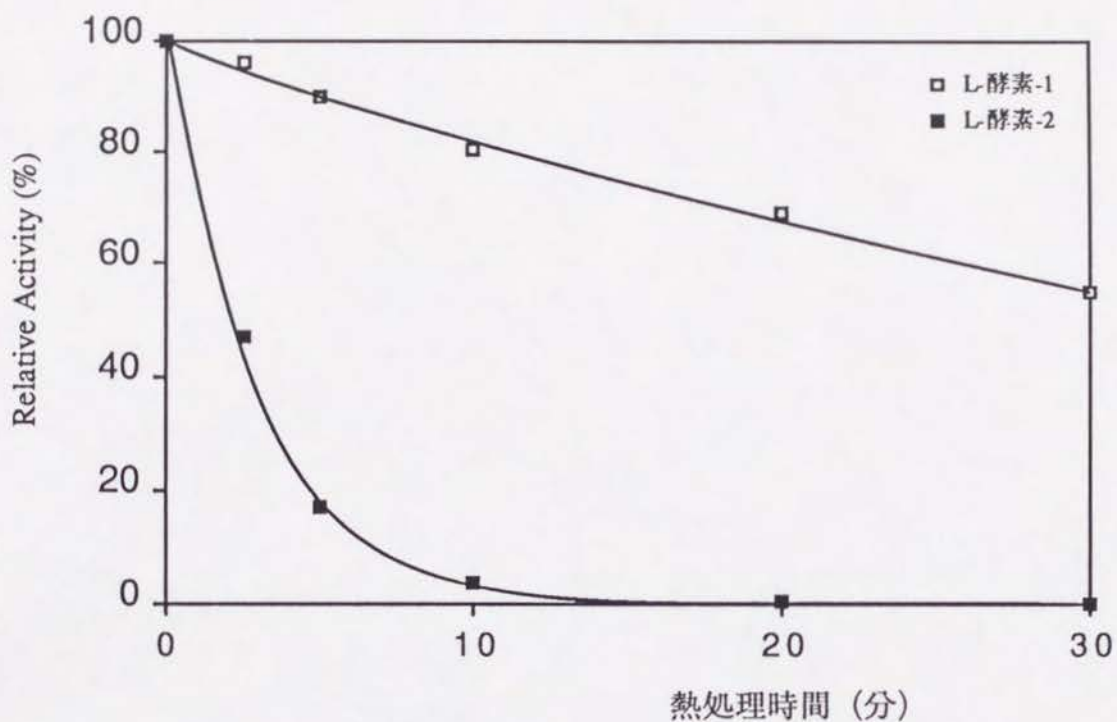


図4-23 50°CでのL-酵素の安定性 (相対活性-処理時間プロット)

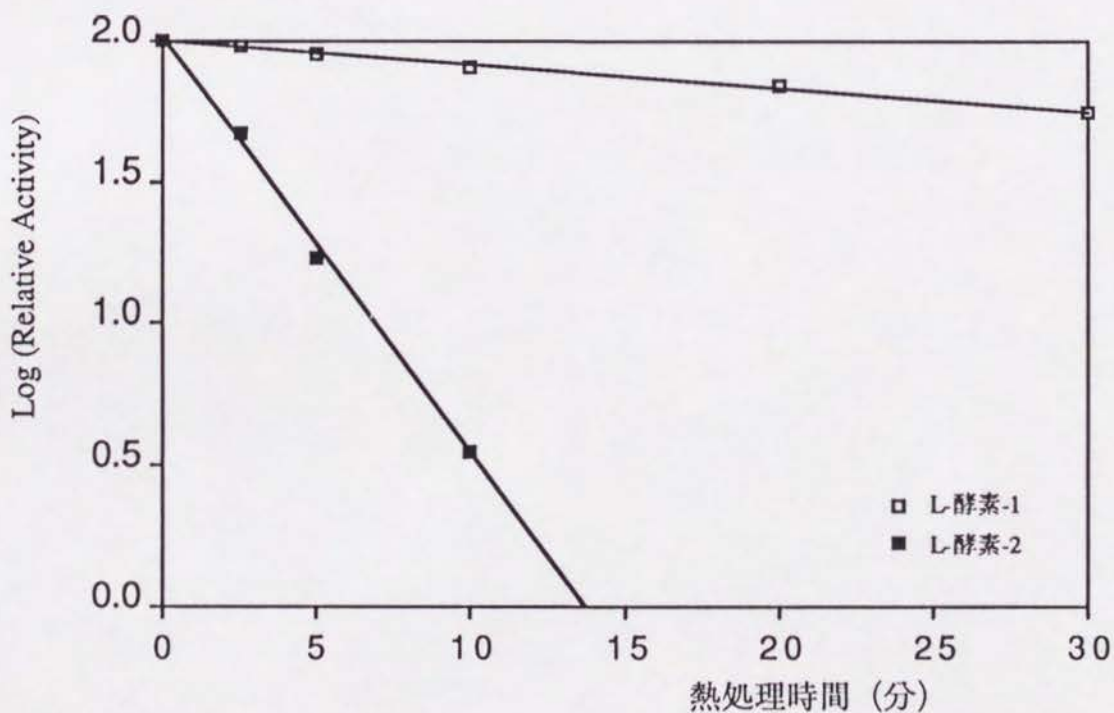


図4-24 50°CでのL-酵素の安定性 (相対活性の対数-処理時間プロット)

4.3 実験の部

測定機器

2.3実験の部に記述した通りである。

クロマトグラフィー用カラム

DEAE-Toyopearl 650 M, Butyl-Toyopearl 650 Mは東ソー株式会社、Superose 12はファルマシア社、Ultra Pack PEI (polyethylene imine), CE (carboxy ethyl), HIC (HI-propyl)は山善株式会社、Cellulofine GLC 2000は生化学工業株式会社、そしてAsahipack GS-510は旭化成株式会社製のものをそれぞれ利用した。

試薬

分子量マーカー (cytochrome c, 12.4 kDa; adenylate kinase, 32 kDa; enolase, 67 kDa; lactate dehydrogenase, 142 kDa; glutamate dehydrogenase, 290 kDaの混合物)はオリエンタル酵母工業株式会社のものを使用した。プロテインアッセイ用キットはバイオラッド社のスタンダードIを使用した。その他の試薬は市販のものを使用した。

リン酸緩衝液の調製

特に記述しない限りは10 mM、pH 7.0のリン酸カリウム緩衝液に、0.05%の2-メルカプトエタノール、1 mMのジチオスレイトールおよび1 mMのフッ化フェニルメチルスルホニルを加えたものを、酵素精製の緩衝溶液(base buffer)として使用した。

酵素活性の測定

酵素活性の測定は光路長1 cmの石英セル中で、基質である4-クロロ-3-オキシソブタン酸エチル (**12b**) (9.64×10^{-4} M)とNADPH(9.53×10^{-5} M)を含む0.10 M、pH 7.0のリン酸緩衝液3.10 ml中に酵素溶液0.05 mlを加えて行った。反応速度は30℃でUVスペクトルにより340 nmのNADPHの極大吸収の減少を測定することにより行った。

本酵素反応においてスキーム4-1が成り立つとすると、定常状態近似を適用して反応速度は式(1)で表すことができる。

$$v = d[P]/dt = k_2[ES] \quad (1)$$

また、生成物Pの生成量は NADP^+ の生成量に等しく、さらにこれはNADPHの減少量に等しいことから、

$$[P] = [\text{NADP}^+] = [\text{NADPH}]_0 - [\text{NADPH}] \quad (2)$$

測定は340 nmにおけるNADPHの吸光度の減少を追跡することによって行っている。NADPHのモル吸光係数を ϵ 、光路長を b とすると、ある時間での吸光度 A は式(3)で表される。

$$A = \epsilon b[\text{NADPH}] = \epsilon b([\text{NADPH}]_0 - [\text{NADP}^+]) \quad (3)$$

式(2)と(3)より、

$$[P] = [\text{NADP}^+] = [\text{NADPH}]_0 - A/\epsilon b \quad (4)$$

式(3)を式(1)に代入し変形すると、

$$-dA/\epsilon b = k_2[ES]dt \quad (5)$$

式(5)を時間0から t まで定積分し変形すると、

$$A = -\epsilon b k_2[ES]t \quad (6)$$

定常状態近似から $d[ES]/dt = 0$ であるので、式(6)より A を t に対してプロットすれば直線が得られ、得られた直線の勾配より $k_2[ES]$ を求めることができ、式(1)の関係から反応速度 v を求めることができる。

この条件でNADPHを1分間に1 μmol 酸化する時の酵素量を1 unitとする。

還元酵素の精製と単離

全ての酵素の精製および単離操作は4℃で行った。また精製中および単離後の酵素溶液は10%のグリセロールを加え冷凍保存した。

パン酵母1 kgをbase buffer 2 lに懸濁させ、ダイノミルを用いて毎分30 mlの流速で細胞膜を破碎した。この懸濁液を100,000 gで30分間遠心分離し、上澄みの酵素抽出液1.4 lを得た。得られた酵素抽出液を透析チューブ(No. 36/32)に封入し、base buffer 6 lを用い12時間透析した。更にもう一度base buffer 6 lを用い12時間透析した。この透析した溶液にポリエチレングリコール(分子量20,000) 500 gを振りかけ12時間放置することによって濃縮した後、再び100,000 gで30分間遠心分離し、酵素抽出溶液400 mlを得た。この時の酵素活

性量は6570 unitであった。

核酸および不要なタンパク質を除去するために、得られた酵素抽出溶液を800 mlのDEAE-Toyopearl 650を充填したカラム(6x30 cm)に吸着させ、base bufferに0~0.4 Mの塩化カリウムを溶解した溶液4 lを2 ml/minの流速で流して、酵素溶液を溶出した。得られた酵素溶液を先程と同様の方法でポリエチレングリコールを用いて250 mlに濃縮し、base buffer 3 lを用いて二回透析した。

透析した溶液を先程と同様のDEAE-Toyopearlカラムに吸着させ、base bufferを2 ml/minの流速で2 l流し、フラクションコレクターで20 mlずつ分取したところ、DEAE-Toyopearlに非吸着の酵素(L-酵素-1)を得た。更に0~0.3 Mの塩化カリウムを溶解させたbase buffer 5 lを、塩濃度を徐々に上げながら2 ml/minの流速で流し20 mlずつのフラクションを得た。塩化カリウムの濃度が0.04 M, 0.06 M, および0.15 Mのところでは三種類の酵素(D-酵素-1、L-酵素-2、およびD-酵素-2)を得た。得られた四種類の酵素をそれぞれポリエチレングリコールを用いて80 mlに濃縮した。クロマトグラムを図4-1に、それぞれの酵素の全活性量を表4-1示す。

得られた四種類の酵素をそれぞれ、20%の硫酸アンモニウムを溶解したbase bufferで平衡化させたButyl-Toyopearl 650カラム(100 ml, 2x30 cm)に吸着させ、20~0%の硫酸アンモニウムを溶解させたbase buffer 500 mlを、塩濃度を徐々に下げながら40 ml/hの流速で流し9 mlずつのフラクションを得た。活性のあるフラクションを集めてCentriCell遠心濃縮器(10,000 NMWL)で0.5 mlに濃縮した。クロマトグラムをそれぞれ図4-26から4-29に示す。

L-酵素-1とL-酵素-2はそれぞれ、Ultra Pack PEIカラムを装着した分取用液体クロマトグラフィーを用いて精製した。カラムをbase bufferで平衡化した後、酵素溶液を吸着させ、0~0.5 Mの塩化ナトリウムを溶解させたbase buffer 200 mlを、塩濃度を徐々に上げながら5 ml/minの流速で流し10 mlずつのフラクションを得た。活性のあるフラクションを集めてCentriCell遠心濃縮器(10,000 NMWL)で3 mlに濃縮した。クロマトグラムをそれぞれ図4-30, 4-31に示す。

得られたL-酵素-1はUltra Pack CEカラムを装着した分取用液体クロマトグラフィーを用いて精製した。カラムをbase bufferで平衡化した後酵素溶液を吸

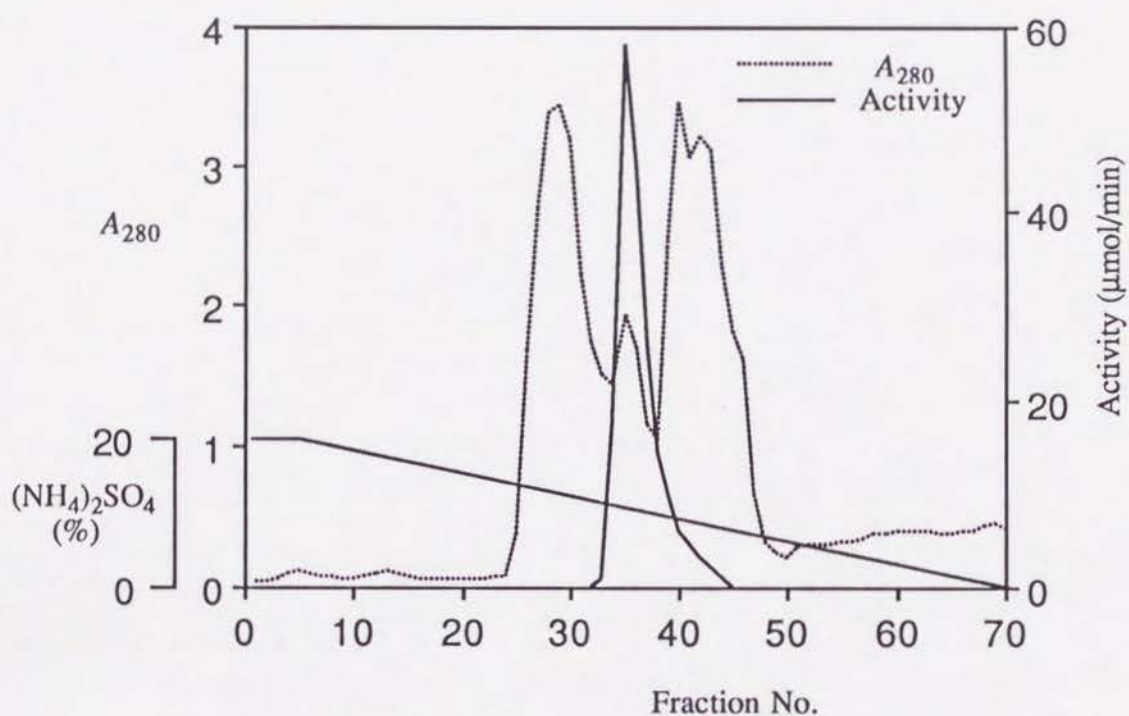


図4-26 Butyl-ToyopearlによるL-酵素-1のクロマトグラム

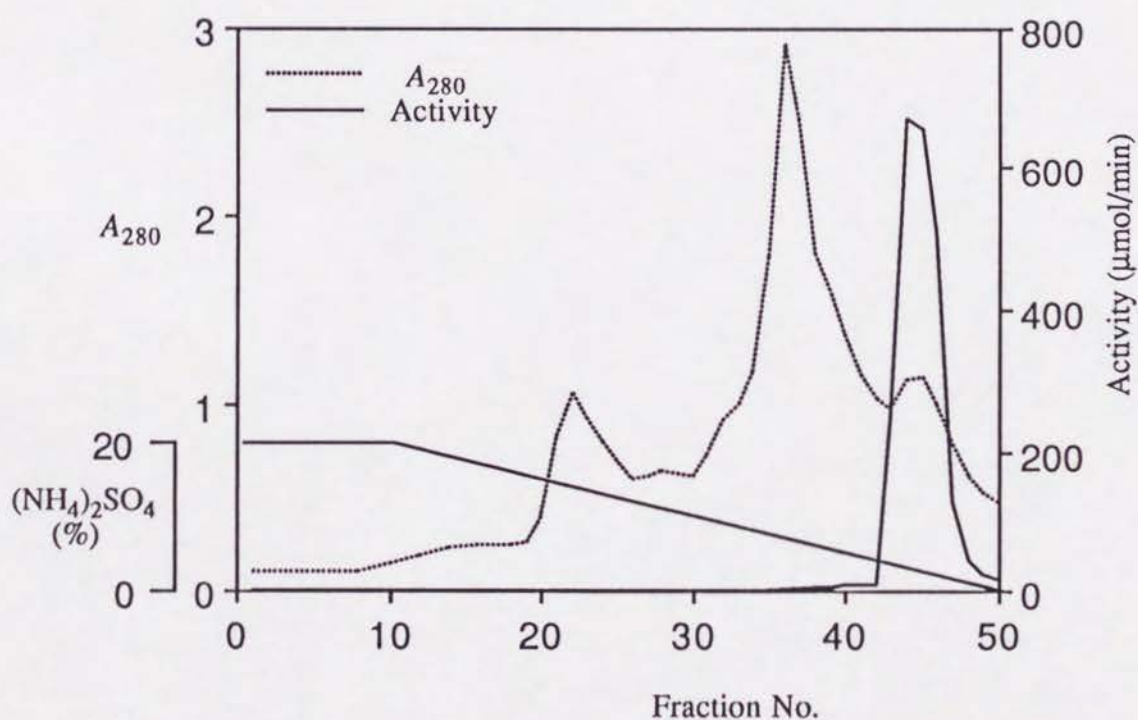


図4-27 Butyl-ToyopearlによるL-酵素-2のクロマトグラム

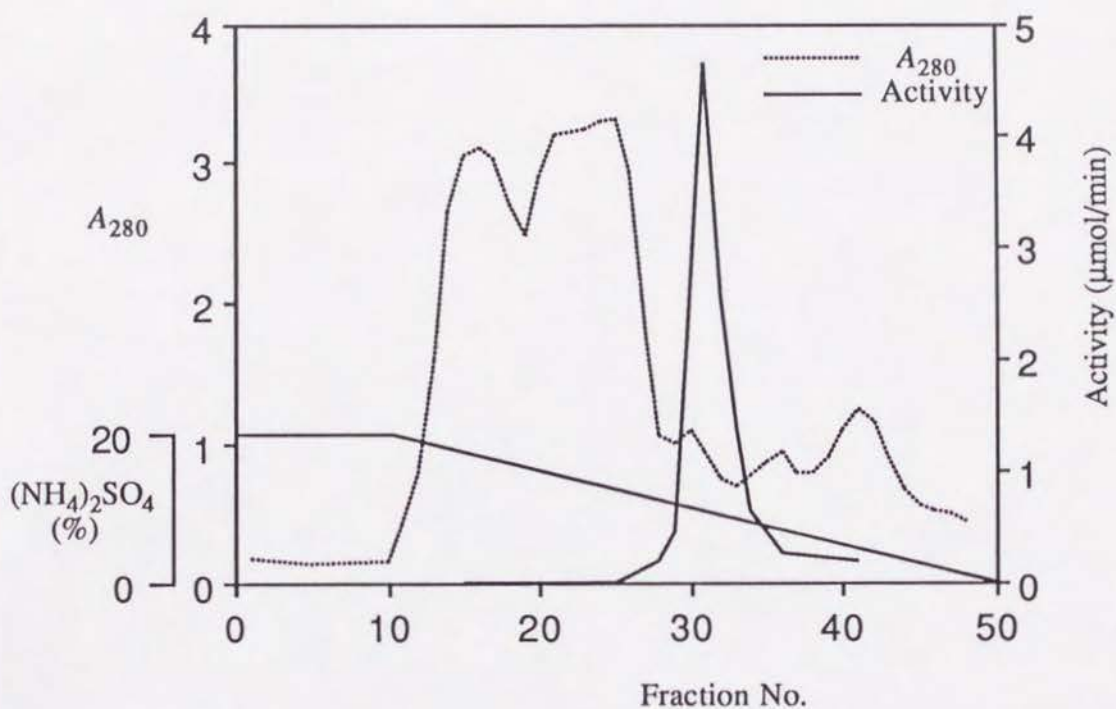


図4-28 Butyl-ToyopearlによるD-酵素-1のクロマトグラム

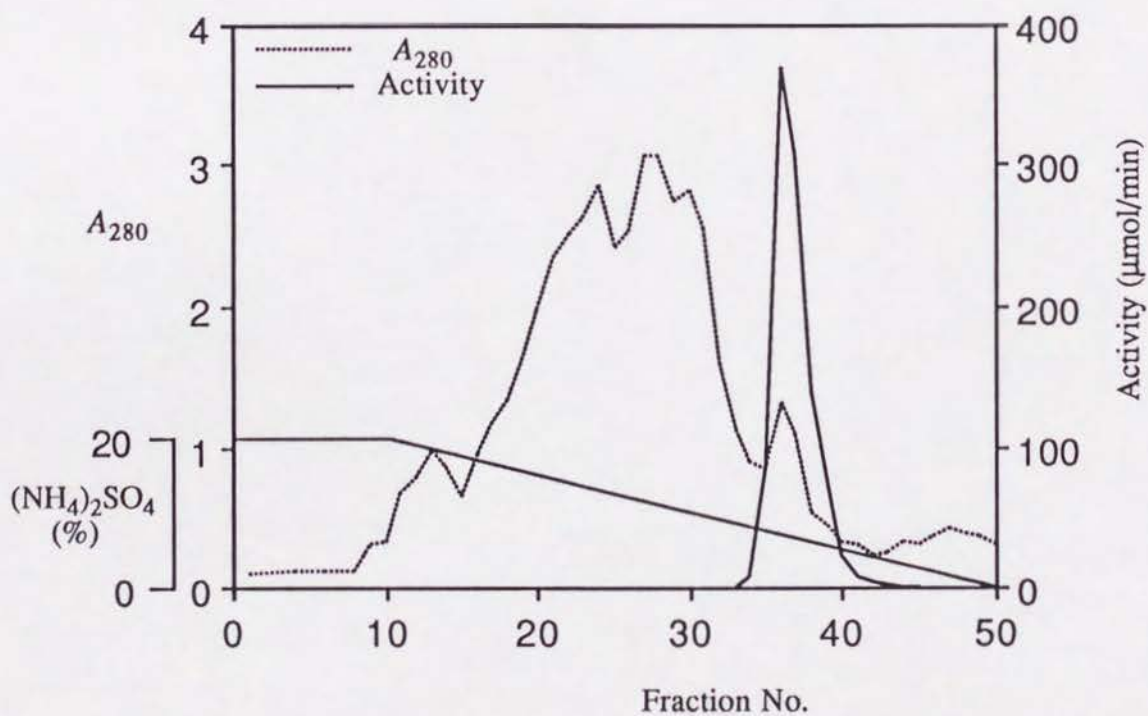


図4-29 Butyl-ToyopearlによるD-酵素-2のクロマトグラム

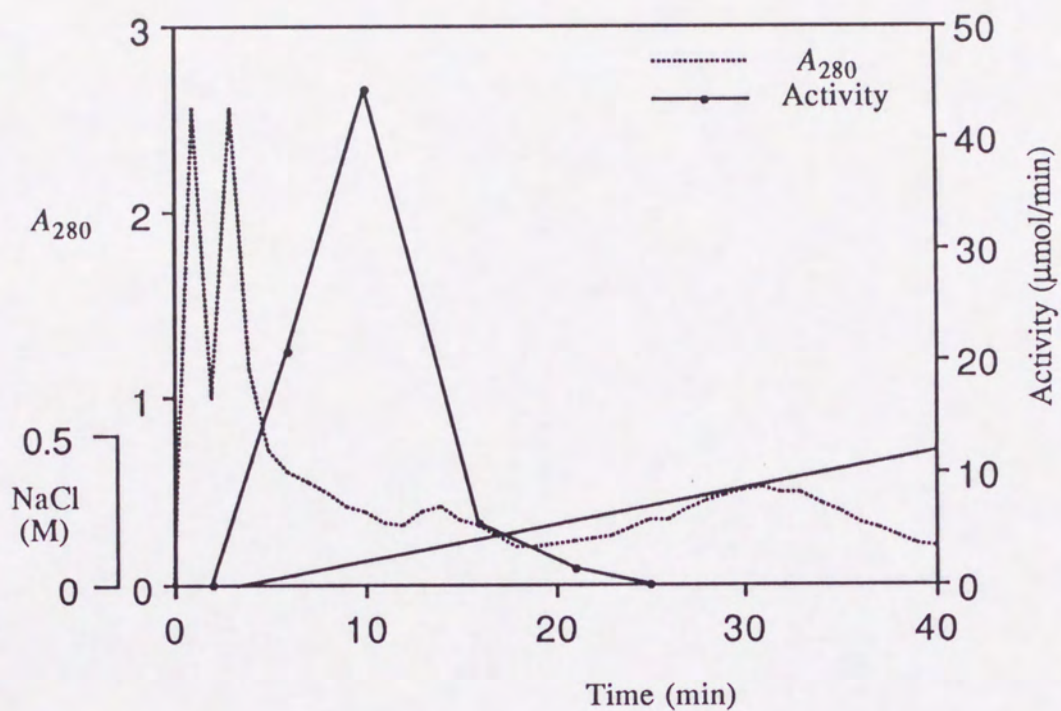


図4-30 PEIによるL-酵素-1のクロマトグラム

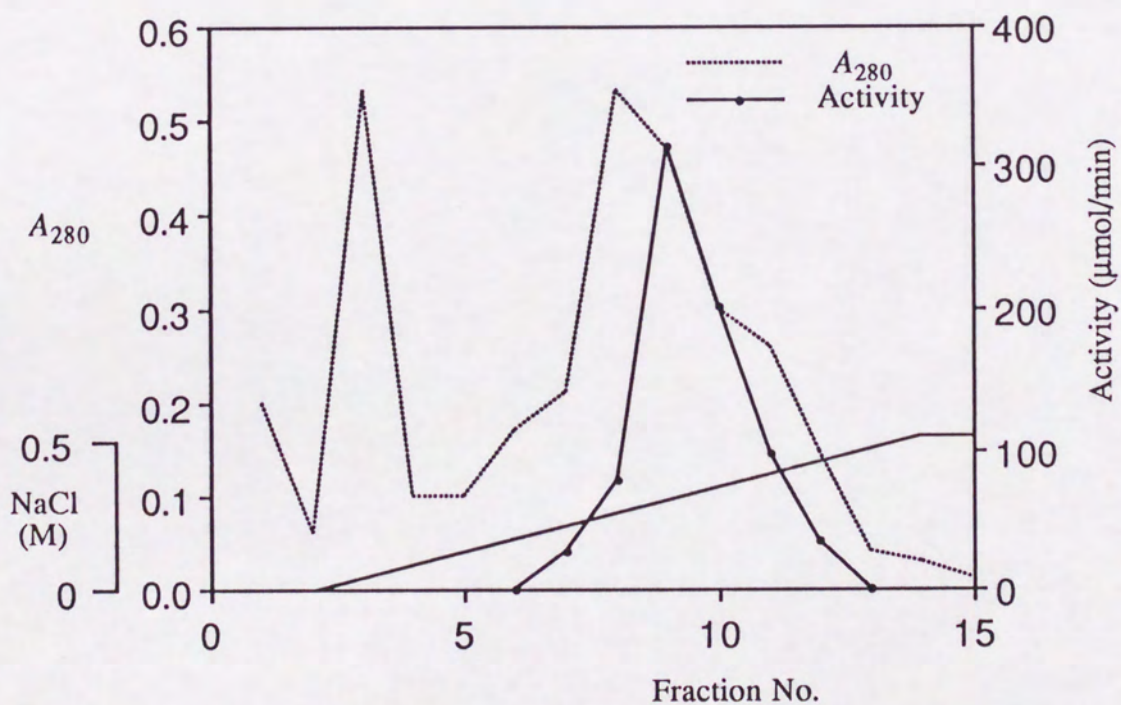


図4-31 PEIによるL-酵素-2のクロマトグラム

着させ、base buffer 50 mlを5 ml/minの流速で流し、その後0.5 Mの塩化ナトリウムを溶解させたbase buffer 50 mlを流した。活性のあるフラクションを集めてCentriCell遠心濃縮器(10,000 NMWL)で1 mlに濃縮した。クロマトグラムをそれぞれ図4-32に示す。

PEIカラムクロマトグラフィーで得られたL-酵素-2はUltra Pack HICカラムを装着した分取用液体クロマトグラフィーを用いて精製した。20%の硫酸アンモニウムを溶解したbase bufferでカラムを平衡化させた後、酵素溶液を吸着させ、20～0%の硫酸アンモニウムを溶解させたbase buffer 100 mlを、塩濃度を徐々に下げながら5 ml/minの流速で流し5 mlずつのフラクションを得た。活性のあるフラクションを集めてCentriCell遠心濃縮器(10,000 NMWL)で1 mlに濃縮した。クロマトグラムをそれぞれ図4-33に示す。

得られたL-酵素-1とL-酵素-2はそれぞれ、0.1 Mの塩化カリウムを溶解させたbase bufferで平衡化したCellulofine GLC 2000カラムに吸着させ、同じ溶液200 mlを2 ml/hの流速で流し2 mlずつのフラクションを得た。活性のあるフラクションを集めてCentriCell遠心濃縮器(10,000 NMWL)で0.1 mlに濃縮した。クロマトグラムをそれぞれ図4-34, 4-35に示す。

分子量の決定

D-酵素-1およびD-酵素-2はSuperose 12カラムを、L-酵素-1およびL-酵素-2はAsahipak GS-510カラムを装着したHPLCを用いて分子量を決定した。0.5 Mの塩化カリウムを溶解したbase bufferを溶離液として用い、0.5 ml/minの流速で流した。分子量マーカーを同様の条件で分析し、横軸に保持時間、縦軸に分子量をとり片対数グラフにプロットして直線を得た。グラフを図4-36, 4-37に示す。それぞれの酵素について最も活性のあるフラクションの保持時間を測定し、グラフから分子量を決定した。結果を表4-1に示す。

単離したL-酵素の純度の検定

単離した二種類のL-酵素の純度は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い検定した。電気泳動はDavisの方法に従い³⁹⁷、トリスグリシン緩衝液(5 mM, pH 8.3)を用いて100 V, 1 mAの条件で行った。どちらのL-酵素も単一のタンパク質である事を確認した(図4-38)。

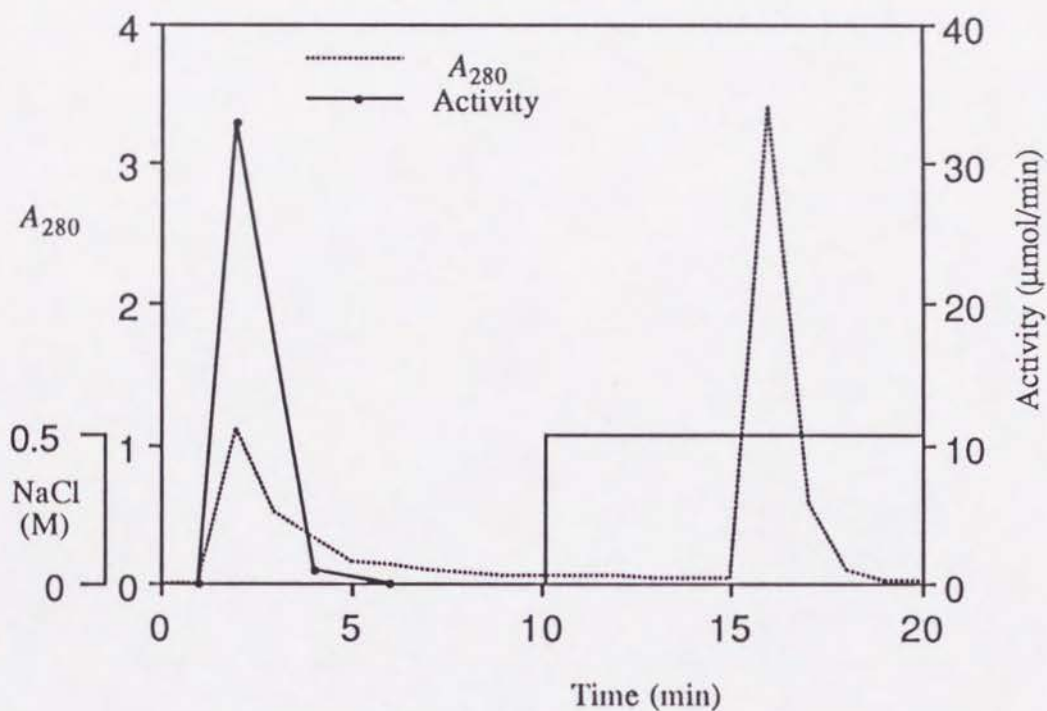


図4-32 CEによるL-酵素-1のクロマトグラム

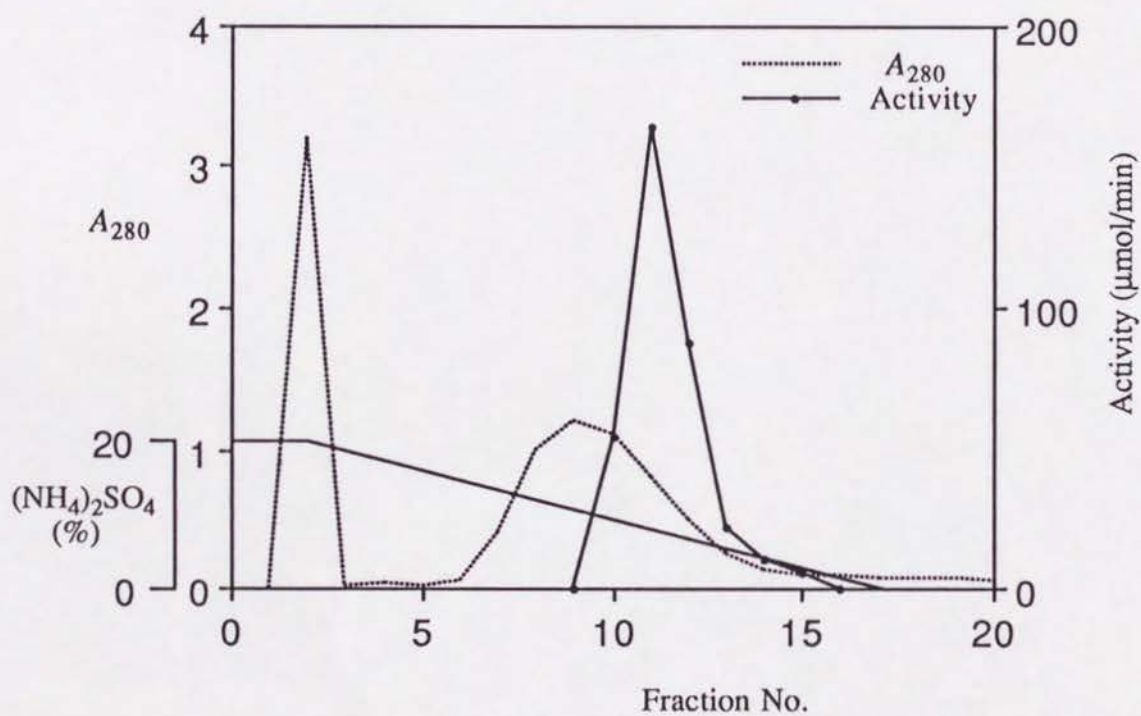


図4-33 HICによるL-酵素-2のクロマトグラム

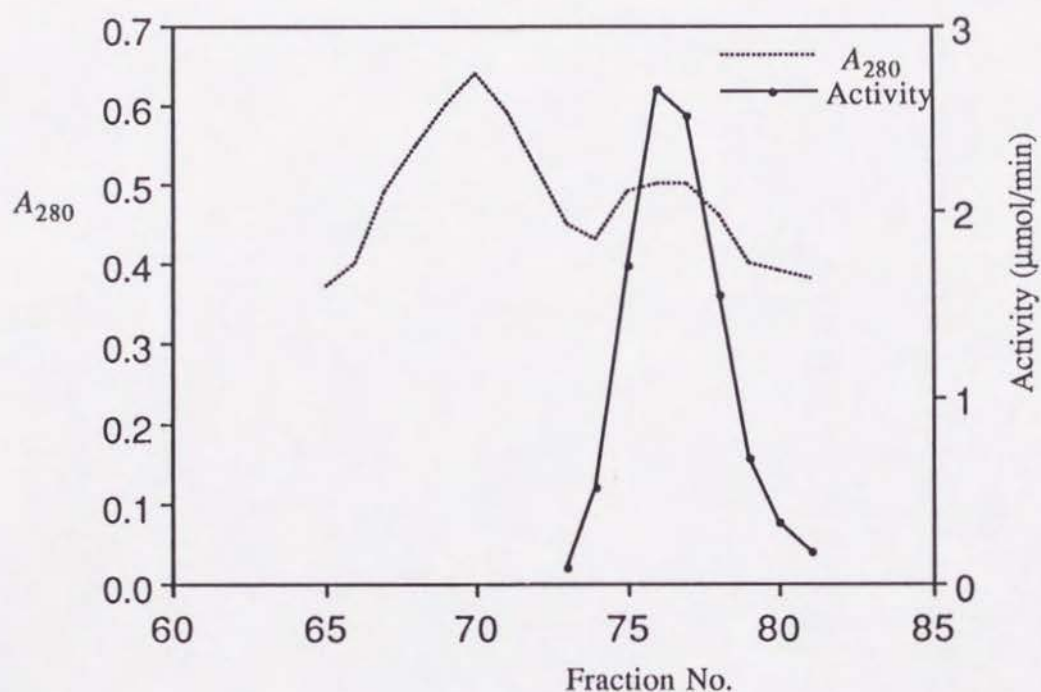


図4-34 CellulofineによるL-酵素-1のクロマトグラム

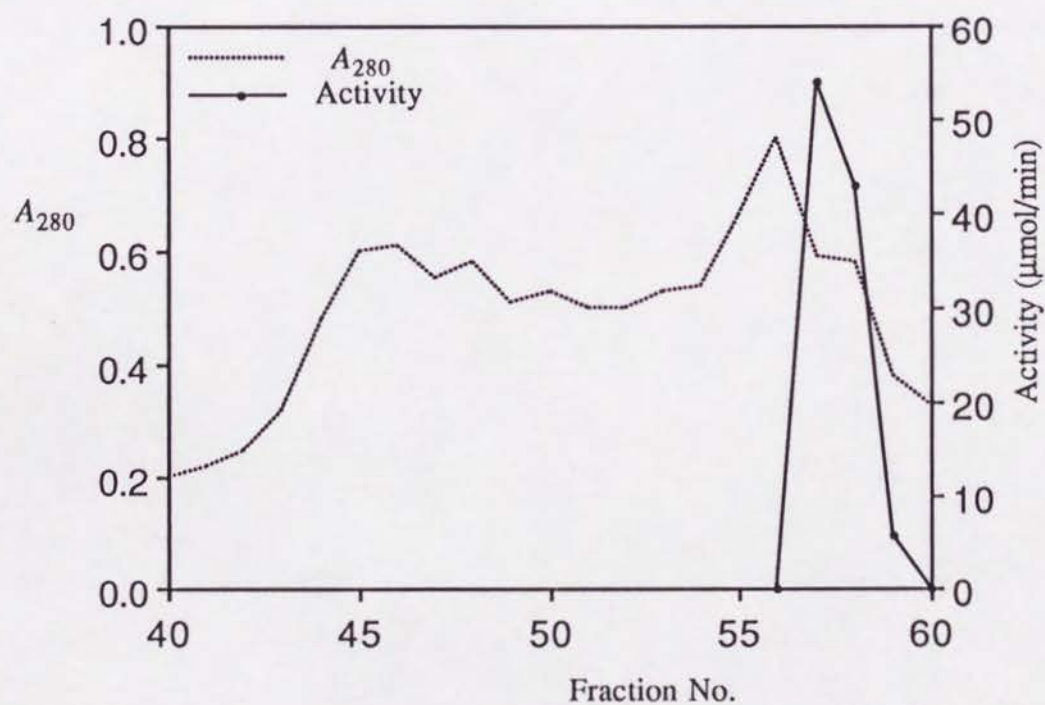


図4-35 CellulofineによるL-酵素-2のクロマトグラム

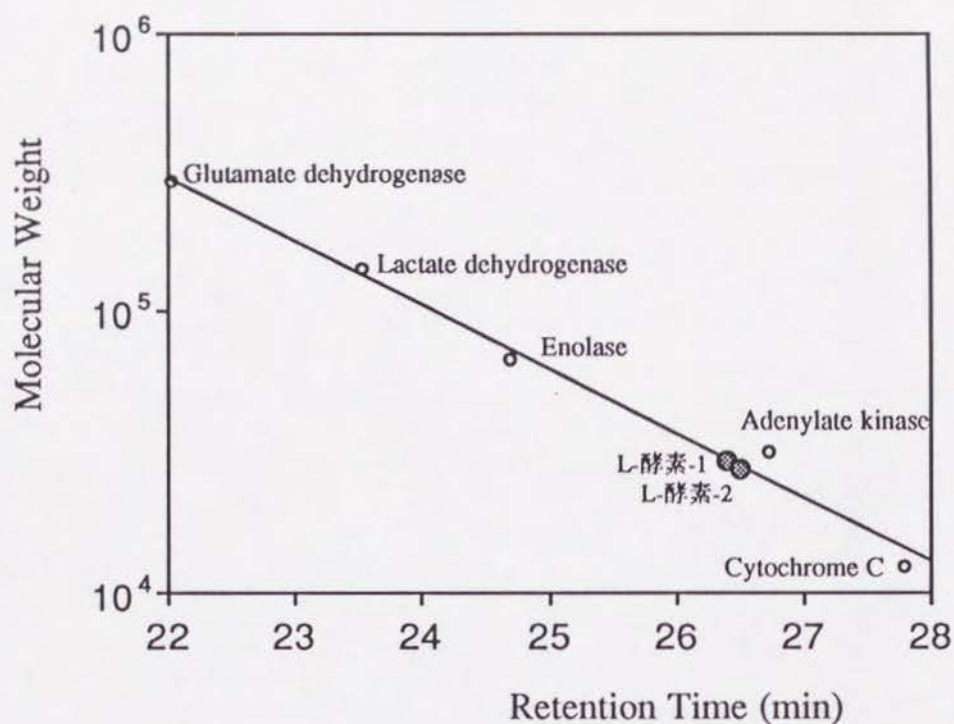


図4-36 ゲルろ過カラム(Asahipak GS-510)クロマトグラフィーによる分子量の決定

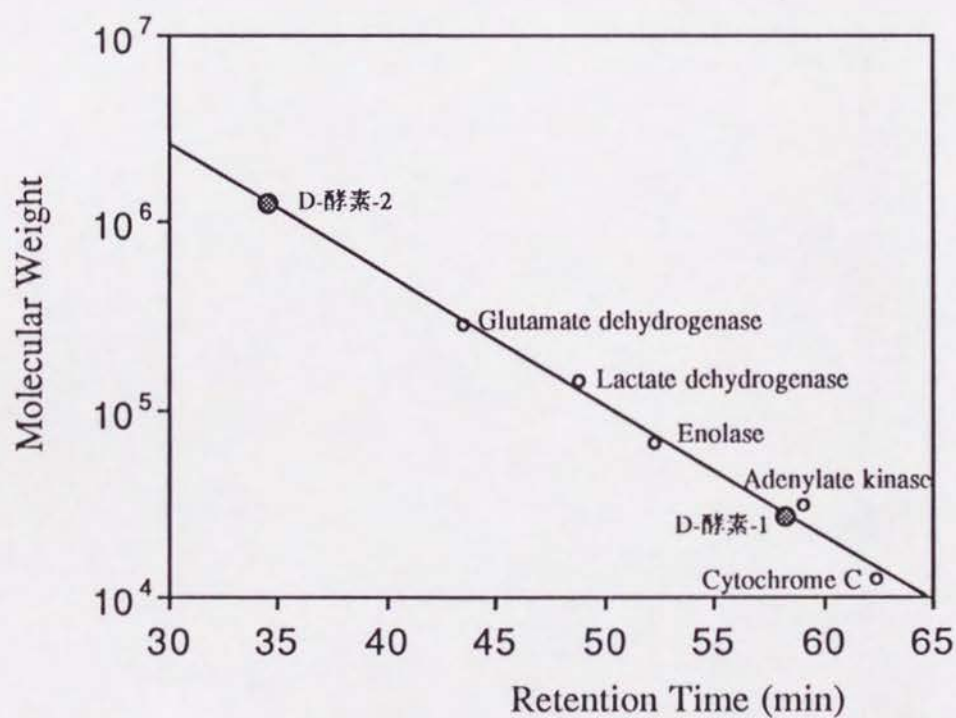
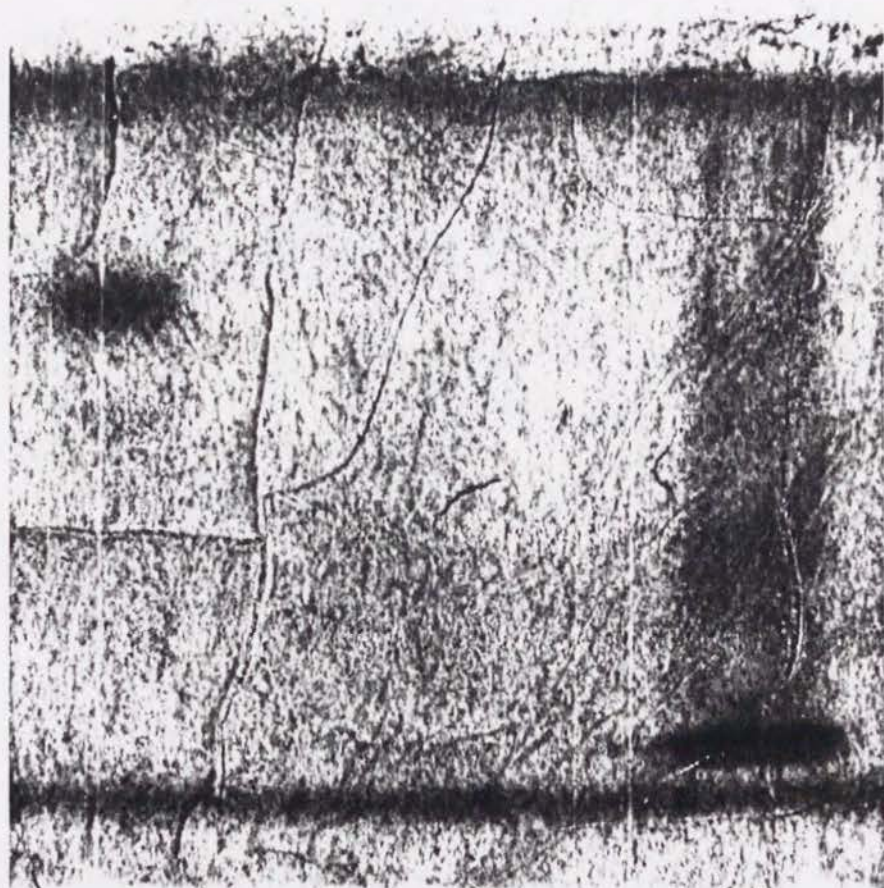


図4-37 ゲルろ過カラム(Superose 12)クロマトグラフィーによる分子量の決定



L-酵素-1

L-酵素-2

図4-38 L-酵素-1とL-酵素-2のポリアクリルアミドゲル電気泳動

パン酵母中に存在する各酵素のタンパク質量の決定

D-酵素-1はパン酵母中に極少量しか含まれていないこと、D-酵素-2は既知の酵素（脂肪酸合成酵素）であることから、それ以外の二種類のL-酵素についてタンパク質量を求めることにした。単離したそれぞれのL-酵素についてパイオラッド社のプロテインアッセイキット^{398,399}を用いてタンパク質量を決定した。酵素1 unit中にはL-酵素-1が86.2 μg 、L-酵素-2は107.0 μg のタンパク質を含んでいる。また、パン酵母1 kg中にはL-酵素-1が246 unit、L-酵素-2が3108 unit存在しているので、それぞれのタンパク質量は21.1 mgおよび332.5 mgとなる。

速度パラメーターの測定

それぞれの酵素につき酵素活性の測定と同様の方法で、基質濃度と酵素量を変化させて反応速度を測定した。結果をもとにX軸を[S]、Y軸に[S]/vをとりプロットして直線を得た^{400,401}。グラフを図4-39から4-42に示す。このグラフのX切片(- K_M)より K_M 値を求めた。結果を表4-2に示す。

酵素による4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル (12b) の還元と立体選択性の決定

精製された酵素溶液 10 unit、NADPH 10 mg、G6PDH (glucose 6-phosphate dehydrogenase) 50 unit、G6P (glucose 6-phosphate) 300 mg、および4-クロロ-3-オキソブタン酸エチル (12b) 82 mgをリン酸緩衝液(0.1 M, pH 7.0) 30 mlに加え、30℃で24時間かき混ぜる。ただしL-酵素-2の場合は更にBSA（牛血清アルブミン）50 mgを加えた。反応終了後、反応液にHyflo Super-Cel 5 gと酢酸エチル 30 mlを加え吸引ろ過する。ろ液を酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下に濃縮した。濃縮残差を分取ガスクロマトグラフ(PEG-20M, 1.5 m, 160℃)によって精製分取し、 β -ヒドロキシエステル (30b) を得た。収率は、L-酵素-1を用いた反応で62%、L-酵素-2を用いた反応で80%、D-酵素-1を用いた反応で45%、そしてD-酵素-2を用いた反応で84%であった。それぞれの β -ヒドロキシエステルの光学純度と立体選択性は2.3に記した方法を用いて決定した。結果を表4-1に示す。

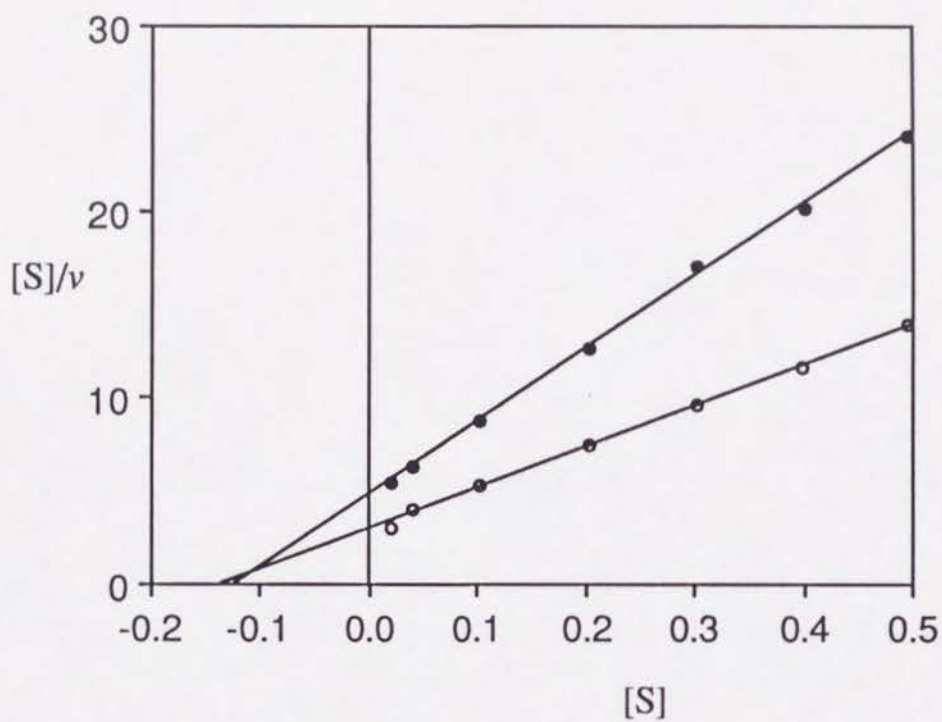


図4-39 L-酵素-1の $[S]$ - $[S]/v$ プロット

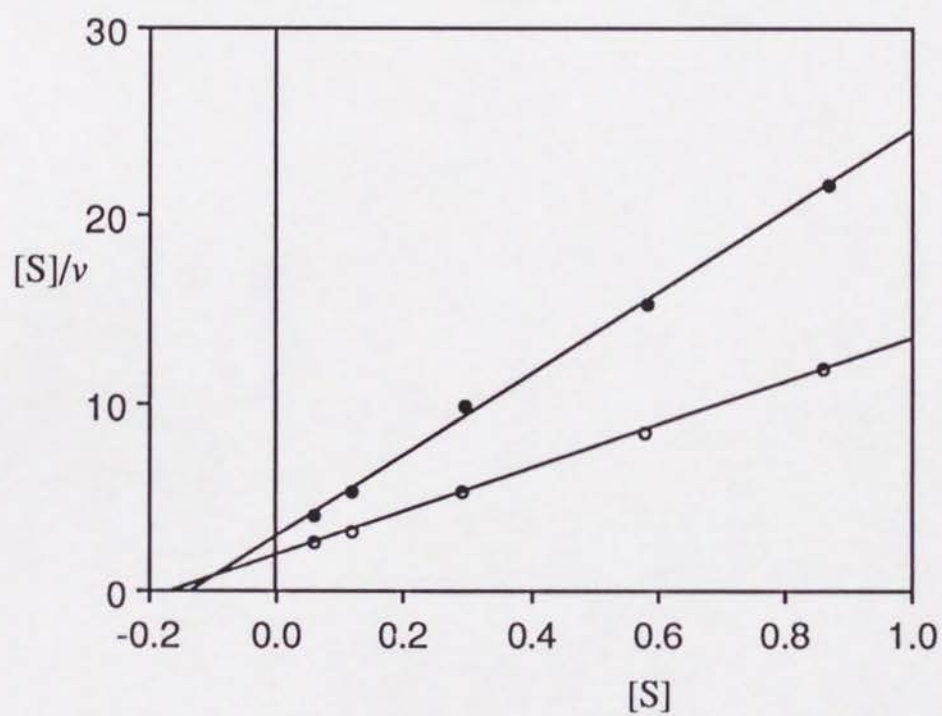


図4-40 L-酵素-2の $[S]$ - $[S]/v$ プロット

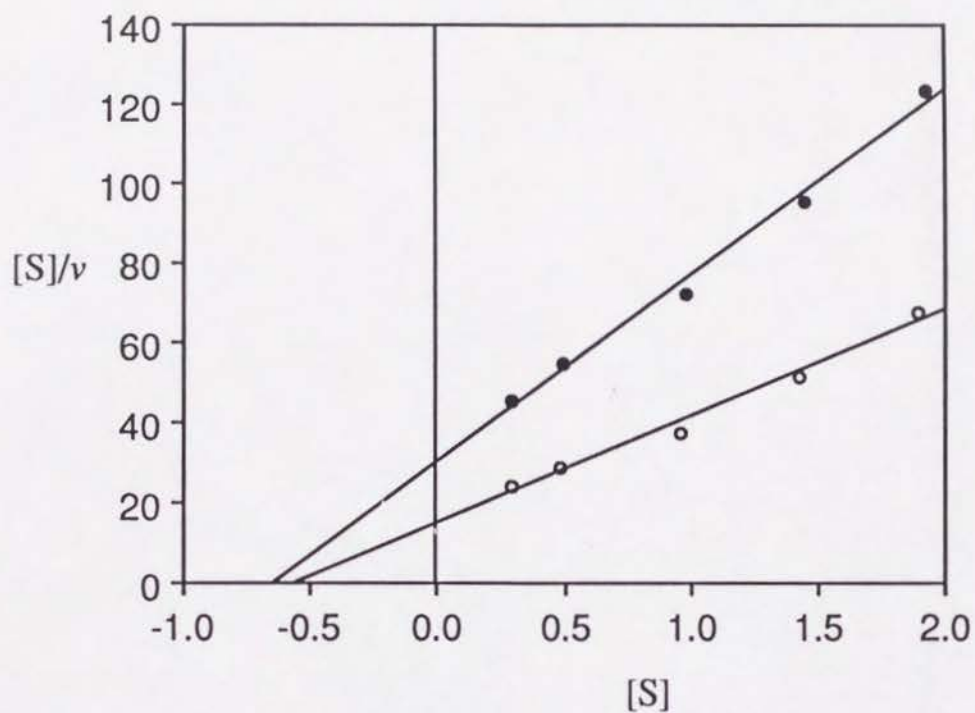


図4-41 D-酵素-1の $[S]$ - $[S]/v$ プロット

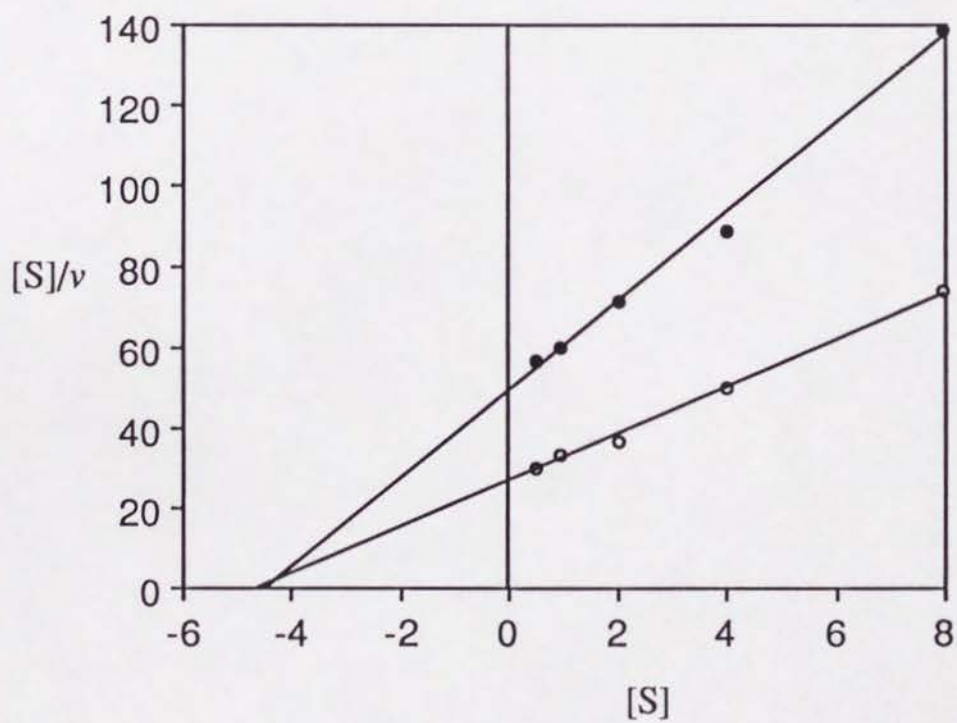


図4-42 D-酵素-2の $[S]$ - $[S]/v$ プロット

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始熱誠なる御指導と御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所大野惇吉教授に衷心より御礼申し上げます。

また、多くの事について御教示下さいました京都大学化学研究所中村薫助教授、京都大学岡信三郎名誉教授、京都大学化学研究所杉山卓助手、近畿大学農学部岡本忠教授、並びに京都大学化学研究所岡村陸雄助手にも厚く御礼申し上げます。

さらに酵素の単離の実験に関して、御指導および御討議頂きました岡山県立短期大学中島伸佳講師に深く感謝致します。また折りにふれ種々御討議頂きました京都大学化学研究所有機単位反応研究部門の皆様に深く感謝致します。

本研究の基礎となる公表論文は次の通りである。

1. Stereochemical Control in Microbial Reduction. 8.
Stereochemical Control in Microbial Reduction of β -Keto Esters
K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, and A. Ohno
Bull. Chem. Soc. Jpn., **62**, 875 (1989).
2. A New Method for Stereochemical Control of Microbial Reduction.
Reduction of β -Keto Esters with Bakers' Yeast Immobilized by
Magnesium Alginate
K. Nakamura, Y. Kawai, S. Oka, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **30**, 2245 (1989).
3. A Novel Method to Synthesize (L)- β -Hydroxyl Esters by the Reduction
with Bakers' Yeast
K. Nakamura, Y. Kawai, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **31**, 267 (1990).
4. Stereochemical Control of Microbial Reduction. 17. Mechanism to
Control the Enantioselectivity in the Reduction with Bakers' Yeast
K. Nakamura, Y. Kawai, N. Nakajima, and A. Ohno
J. Org. Chem., **56**, 4778 (1991).
5. Stereochemical Control in Microbial Reduction. 19. Effect of the Heat
Treatment on the Diastereoselectivity of the Reduction with Bakers' Yeast
K. Nakamura, Y. Kawai, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **32**, 2927 (1991).

その他の著者の公表論文を参考論文として以下に示す。

6. Stereoselective Synthesis of (2*R*,3*S*)-*syn*-2-allyl-3-hydroxybutanoate
Mediated by an Enzymatic System from Bakers' Yeast
K. Nakamura, T. Miyai, Y. Kawai, N. Nakajima, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **31**, 1159 (1990).

7. Stereochemical Control in Microbial Reduction. XV.
Preparation of (2*R*, 3*S*)-*syn*-2-Allyl-3-hydroxybutanoate
K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B. R. Babu,
and A. Ohno
Bull. Chem. Soc. Jpn., **63**, 1713 (1990).
8. Stereochemical Control in Diastereoselective Reduction with Bakers' Yeast
K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **31**, 3631 (1990).
9. Stereochemical Control in Microbial Reduction. 18. Mechanism of
Stereochemical Control in Diastereoselective Reduction with Bakers' Yeast
K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakajima, and A. Ohno
Bull. Chem. Soc. Jpn., **64**, 1467 (1991).
10. Bakers' Yeast Reduction in Benzene
K. Nakamura, S. Kondo, Y. Kawai, and A. Ohno
Tetrahedron Lett., **32**, 7075 (1991).

References

1. E. Fischer, *Ber.*, **23**, 2611 (1890).
2. D. J. Cram and F. A. A. Elhafez, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 5828 (1952).
3. V. Prelog, *Helv. Chim. Acta*, **36**, 308 (1953).
4. J. D. Morrison and H. S. Mosher, "Asymmetric Organic Reactions," Prentice-Hall, Inc., Engelwood Cliffs, New Jersey (1971).
5. J. D. Morrison (ed), "Asymmetric Synthesis," Vols. 1-5, Academic Press, New York (1983-1985).
6. N. L. Allinger, E. L. Eliel, and S. H. Wilen (ed), "Topics in Stereochemistry," Vols. 1-18, Wiley, New York (1967-1988).
7. H. B. Kagan and T.-P. Dang, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 481 (1971).
8. H. B. Kagan and T.-P. Dang, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 6429 (1972).
9. A. Miyashita, A. Yasuda, H. Takaya, K. Toriumi, I. Ito, T. Souchi, and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7932 (1980).
10. R. Noyori and H. Takaya, *Acc. Chem. Res.*, **23**, 345 (1990).
11. M. Nógrádi, "Stereoselective Synthesis," VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1987).
12. Y. Ohnishi, M. Kagami, and A. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4766 (1975).
13. A. Ohno, M. Ikeguchi, T. Kimura, and S. Oka, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 7036 (1979).
14. A. Ohno and S. Ushida, "Mechanistic Models of Asymmetric Reductions," in "Lecture Notes in Bio-organic Chemistry," Vol. 1, ed by E. Baulieu, L. Jaenicke, V. Massey, R. J. P. Williams, E.-L. Winnacker, and B. Zerner, Springer-Verlag, Berlin (1986).
15. M. M. Midland, A. Tramontano, and S. A. Zderic, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 5211 (1977).
16. M. M. Midland, D. C. McDowell, R. L. Hatch, and A. Tramontano, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 867 (1980).
17. R. Noyori, I. Tomino, and Y. Tanimoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3129 (1979).

18. C. H. Heathcock, *Science*, **214**, 395 (1981).
19. C. H. Heathcock and L. A. Flippin, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 1667 (1983).
20. D. A. Evans, J. M. Takacs, L. R. McGee, M. D. Ennis, D. J. Mathre, and J. Bartroli, *Pure Appl. Chem.*, **53**, 1109 (1981).
21. D. A. Evans, J. Bartroli, and T. L. Shih, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2127 (1981).
22. S. Masamune, Sk. A. Ali, D. L. Snitman, and D. S. Garvey, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **19**, 557 (1980).
23. S. Masamune, W. Choy, F. A. J. Kerdesky, and B. Imperiali, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 1566 (1981).
24. T. Mukaiyama, N. Iwasawa, R. W. Stevens, and T. Haga, *Tetrahedron*, **40**, 1381 (1984).
25. Y. Ito, M. Sawamura, and T. Hayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 6405 (1986).
26. B. M. Trost, D. O'Krongly, J. L. Belletire, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7595 (1980).
27. W. Oppolzer, M. Kurth, D. Reichlin, C. Chapuis, M. Mohnhaupt, and F. Moffat, *Helv. Chim. Acta*, **64**, 2802 (1981).
28. S. Hashimoto, N. Komeshima, and K. Koga, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 437 (1979).
29. H. C. Brown and G. Zweifel, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 486 (1961).
30. H. C. Brown and B. Singaram, *Acc. Chem. Res.*, **21**, 287 (1988).
31. T. Katsuki and K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5974 (1980).
32. C. Neuberg and H. Steenboch, *Biochem. Z.*, **52**, 494 (1913).
33. C. Neuberg and F. F. Nord, *Chem. Ber.*, **52**, 2248 (1919).
34. C. Neuberg and E. Welde, *Biochem. Z.*, **60**, 472 (1914).
35. C. Neuberg and M. Ringer, *Biochem. Z.*, **71**, 226 (1915).
36. C. Neuberg and E. Welde, *Biochem. Z.*, **67**, 18 (1914).
37. D. H. Peterson and H. C. Murray, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1871 (1952).
38. A. Carek, O. Hanc, and M. Tarda, "Microbial Transformation of Steroids," Academia, Prague (1966).

39. W. Charney and H. L. Herzog, "Microbial Transformation of Steroids," Academic Press, New York (1967).
40. T. Tosa, T. Mori, N. Fuse, and I. Chibata, *Enzymologia*, **31**, 225 (1966).
41. C. Neuberg and F. F. Nord, *Chem. Ber.*, **52**, 2237 (1919).
42. V. Prelog, *Pure. Appl. Chem.*, **9**, 119 (1964).
43. R. MacLeod, H. Prosser, L. Fikentscher, J. Lanyi, and H. S. Mosher, *Biochemistry*, **3**, 838 (1964).
44. B. S. Deol, D. D. Ridley, and G. W. Simpson, *Aust. J. Chem.*, **29**, 2459 (1976).
45. A. I. Meyers and R. A. Amos, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 870 (1980).
46. K. Mori, *Tetrahedron*, **37**, 1341 (1981).
47. K. Mori and K. Tanida, *Tetrahedron*, **37**, 3221 (1981).
48. K. Hintzer, B. Koppenhöfer, and V. Schurig, *J. Org. Chem.*, **47**, 3850 (1982).
49. B. Wipf, E. Kupfer, R. Bertazzi, and H. G. W. Leuenberger, *Helv. Chim. Acta*, **66**, 485 (1983).
50. Y. Naoshima, A. Nakamura, T. Nishiyama, T. Haramaki, M. Mende, and Y. Munakata, *Chem. Lett.*, 1023 (1989).
51. Y. Naoshima, J. Maeda, Y. Munakata, T. Nishiyama, M. Kamezawa, and H. Tachibana, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 964 (1990).
52. Y. Naoshima, T. Nishiyama, and Y. Munakata, *Chem. Lett.*, 1517 (1989).
53. M. P. Dillon, M. A. Hayes, T. J. Simpson, and J. B. Sweeney, *BioMed. Chem. Lett.*, **1**, 223 (1991).
54. K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *Chem. Lett.*, 679 (1987).
55. K. Nakamura, M. Higaki, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4213 (1985).
56. T. Uematsu, T. Umemura, and K. Mori, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 597 (1983).
57. K. Mori and S. Senda, *Tetrahedron*, **41**, 541 (1985).
58. K. Mori, H. Mori, and T. Sugai, *Tetrahedron*, **41**, 919 (1985).
59. K. Mori and T. Ebata, *Tetrahedron*, **42**, 4421 (1986).

60. T. Katsuki and M. Yamaguchi, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 651 (1987).
61. K. Mori, *Tetrahedron*, **45**, 3223 (1989).
62. A. I. Meyers and R. A. Amos, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 870 (1980).
63. D. W. Brooks and R. P. Kellogg, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4991 (1982).
64. T. Chiba, M. Nagatsuma, and T. Nakai, *Chem. Lett.*, 1343 (1985).
65. T. Chiba and T. Nakai, *Chem. Lett.*, 651 (1985).
66. G. Fráter, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 2829 (1979).
67. P. DeShong, M.-T. Lin, and J. J. Perez, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2091 (1986).
68. D. R. Crump, *Aust. J. Chem.*, **35**, 1945 (1982).
69. M. Hirama, T. Nakamine, and S. Ito, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5281 (1986).
70. T. Sato, *Can. J. Chem.*, **65**, 2732 (1987).
71. F. Bennett, D. W. Knight, and G. Fenton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 133 (1991).
72. R. Chenevert and G. Fortier, *Chem. Lett.*, 1603 (1991).
72. A. Kumar, D. H. Ner, and S. Y. Dike, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 1901 (1991).
73. B. Zhou, A. S. Gopalan, F. VanMiddlesworth, W. R. Shieh, and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5925 (1983).
74. D. Seebach, P. Renaud, W. B. Schweizer, and M. F. Züger, *Helv. Chim. Acta*, **67**, 1843 (1984).
75. T. Kitazume and N. Ishikawa, *Chem. Lett.*, 237 (1983).
76. A. S. Gopalan and H. K. Jacobs, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1897 (1990).
77. C. Fuganti and P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 101 (1985).
78. C. Fuganti, P. Grasselli, P. F. Seneci, and P. Casati, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5275 (1986).
79. D. Seebach and M. Eberle, *Synthesis*, 37 (1986).
80. A. Manzocchi, R. Casati, A. Fiecchi, and E. Santaniello, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2753 (1987).
81. M. Hirama, T. Nakamine, and S. Ito, *Chem. Lett.*, 1381 (1986).

82. D. W. Brooks, R. P. Kellogg, and C. S. Cooper, *J. Org. Chem.*, **52**, 192 (1987).
83. D. W. Brooks, N. C. de Lee, and R. Peevey, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 4623 (1984).
84. K. Nakamura, K. Ushio, S. Oka, A. Ohno, and S. Yasui, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 3979 (1984).
85. M. Christen and D. H. G. Crout, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 264 (1988).
86. H. Chikashita, K. Ohkawa, and K. Itoh, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3513 (1989).
87. K. Kurumaya, K. Takatori, R. Isii, and M. Kajiwara, *Heterocycles*, **30**, 745 (1990).
88. K. Mori, H. Mori, and T. Sugai, *Tetrahedron*, **41**, 919 (1985).
89. M. Kawai, K. Tajima, S. Mizuno, K. Niimi, H. Sugioka, Y. Butsugan, A. Kozawa, T. Asano, and Y. Imai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 3014 (1988).
90. T. Itoh, Y. Yonekawa, T. Sato, and T. Fujisawa, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5405 (1986).
91. M. Hirama, M. Shimizu, and M. Iwashita, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 599 (1983).
92. M. Utaka, H. Higashi, and A. Takeda, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1368 (1987).
93. M. Utaka, H. Watabu, H. Higashi, T. Sasaki, S. Tsuboi, and S. Torii, *J. Org. Chem.*, **55**, 3917 (1990).
94. G. Fráter, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 2825 (1979).
95. K. Nakamura, T. Miyai, K. Nozaki, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3155 (1986).
96. K. Nakamura, T. Miyai, A. Nagar, S. Oka, and A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 1179 (1989).
97. D. Buisson, C. Sanner, M. Larcheveque, and R. Azerad, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3939 (1987).
98. H. Watabu, M. Ohkubo, H. Matsubara, T. Sakai, S. Tsuboi, and M. Utaka, *Chem. Lett.*, 2183 (1989).
99. M. F. Züger, F. Giovannini, and D. Seebach, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **22**, 1012 (1983).

100. K. Nakamura, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2089 (1988).
101. P. K. Matzinger and H. G. W. Leuenberger, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 208 (1985).
102. D. Seebach, S. Roggo, T. Maetzke, H. Braunschweiger, J. Cercus, and M. Krieger, *Helv. Chim. Acta.*, **70**, 1605 (1987).
103. D. Buisson and R. Azerad, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2631 (1986).
104. K. Nakamura, K. Inoue, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *J. Org. Chem.*, **53**, 2589 (1988).
105. K. Nakamura, T. Miyai, K. Inoue, S. Kawasaki, S. Oka, and A. Ohno, *Biocatalysis*, **3**, 17 (1990).
106. S. Tsuboi, H. Furutani, M. Utaka, and A. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 2709 (1987).
107. Y. Naoshima, H. Ozawa, H. Kondo, and S. Hayashi, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 1431 (1983).
108. M. Utaka, H. Watabu, and A. Takeda, *J. Org. Chem.*, **52**, 4363 (1987).
109. M. Utaka, H. Watabu, and A. Takeda, *Chem. Lett.*, 1475 (1985).
110. Y. Naoshima and H. Hasegawa, *Chem. Lett.*, 2379 (1987).
111. Y. Naoshima, H. Hasegawa, T. Nishiyama, and A. Nakamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 608 (1989).
112. R. Bernardi, R. Cardillo, and D. Ghiringhelli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 460 (1984).
113. J. Ehrler and D. Seebach, *Helv. Chim. Acta*, **72**, 793 (1989).
114. D. Seebach, F. Giovannini, and B. Lamatsch, *Helv. Chim. Acta*, **68**, 958 (1985).
115. K. Ushio, K. Inoue, K. Nakamura, S. Oka, and A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2657 (1986).
116. R. Tacke, H. Linoh, B. Stumpf, W.-R. Abraham, K. Kieslich, and L. Ernst, *Z. Naturforsch*, **38b**, 616 (1983).

117. S. K. Ghosh, S. Chattopadhyay, and V. R. Mamdapur, *Tetrahedron*, **47**, 3089 (1991).
118. R. W. Hoffmann, W. Ladner, K. Steinbach, W. Massa, R. Schmidt, and G. Snatzke, *Chem. Ber.*, **114**, 2786 (1981).
119. G. Fráter, U. Müller, and W. Günter, *Tetrahedron*, **40**, 1269 (1984).
120. H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4376 (1983).
121. K. Nakamura, T. Miyai, K. Fukushima, Y. Kawai, B. Ramesh Babu, and A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 1713 (1990).
122. C. M. Afonso, M. T. Barros, L. Godinho and C. D. Maycock, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2707 (1989).
123. T. Sugai, D. Sakuma, N. Kobayashi, and H. Ohta, *Tetrahedron*, **47**, 7237 (1991).
124. T. Sato, M. Tsurumaki, and T. Fujisawa, *Chem. Lett.*, 1367 (1986).
125. T. Sakai, T. Nakamura, K. Fukuda, E. Amano, M. Utaka, and A. Takeda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 3185 (1986).
126. T. Fujisawa, T. Itoh, and T. Sato, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5083 (1984).
127. H. Akita, H. Matsukura, and T. Oishi, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5397 (1986).
128. M. Soukup, B. Wipf, E. Hochuli, and H. G. W. Leuenberger, *Helv. Chim. Acta*, **70**, 232 (1987).
129. D. Buisson, S. Henrot, M. Larcheveque, and R. Azerad, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5033 (1987).
130. H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 4384 (1983).
131. H. Akita, H. Matsukura, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 2656 (1986).
132. K. Horikoshi, A. Furuichi, H. Koshiji, H. Akita, and T. Oishi, *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 435 (1983).
133. H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4051 (1982).

134. H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1333 (1984).
135. H. Akita, H. Matsukura, K. Sonommoto, A. Tanaka, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 4985 (1987).
136. A. Furuichi, H. Akita, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1619 (1984).
137. H. Akita, H. Koshiji, A. Furuichi, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 2009 (1983).
138. T. Kitazume and T. Kobayashi, *Synthesis*, 187 (1987).
139. T. Sato, H. Maeno, T. Noro, and T. Fujisawa, *Chem. Lett.*, 1739 (1988).
140. R. W. Hoffmann, W. Helbig, and W. Ladner, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 3479 (1982).
141. R. W. Hoffmann and W. Ladner, *Chem. Ber.*, **116**, 1631 (1983).
142. G. Fráter, *Helv. Chim. Acta*, **63**, 1383 (1980).
143. T. Kitahara and K. Mori, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 451 (1985).
144. H. Suemune, Y. Mizuhara, H. Akita, T. Oishi, and K. Sakai, *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 3112 (1987).
145. S. Iriuchijima and M. Ogawa, *Synthesis*, 41 (1982).
146. H. Akita, A. Furuichi, H. Koshiji, K. Horikoshi, and T. Oishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 1342 (1984).
147. S. Tsuboi, E. Nishiyama, H. Furutani, M. Utaka, and A. Takeda, *J. Org. Chem.*, **52**, 1359 (1987).
148. S. Tsuboi, E. Nishiyama, M. Utaka, and A. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 1915 (1986).
149. F. Moriuchi, H. Muroi, and H. Aibe, *Chem. Lett.*, 1141 (1987).
150. G. Fantin, M. Fogagnolo, A. Medici, P. Pedrini, S. Poli, F. Gardini, and M. E. Guerzoni, *Tetrahedron :Asymmetry*, **2**, 243 (1991).
151. Y. Naoshima, H. Hasegawa, and T. Saeki, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 3417 (1987).
152. C.-Q. Han, D. DiTullio, Y.-F. Wang, and C. J. Sih, *J. Org. Chem.*, **51**, 1253 (1986).

153. Y. Takaishi, Y.-L. Yang, D. DiTullio, and C. J. Sih, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 5489 (1982).
154. L. Dasaradhi, N. W. Fadnavis, and T. Bhalerao, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 729 (1990).
155. K. Kabuto, M. Imuta, E. S. Kempner, and H. Ziffer, *J. Org. Chem.*, **43**, 2357 (1978).
156. M. Imuta, K. Kawai, and H. Ziffer, *J. Org. Chem.*, **45**, 3352 (1980).
157. M. Takeshita, K. Terada, N. Akutsu, S. Yoshida, and T. Sato, *Heterocycles*, **26**, 3051 (1987).
158. J. Gillois, D. Buisson, R. Azerad, and G. Jaouen, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1224 (1988).
159. A. Manzacchi, A. Fiecchi, and E. Santaniello, *J. Org. Chem.*, **53**, 4405 (1988).
160. M. Imuta and H. Ziffer, *J. Org. Chem.*, **43**, 3530 (1978).
161. M. R. Uskokovic, R. L. Lewis, J. J. Partridge, C. W. Despreaux, and D. L. Pruess, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 6742 (1979).
162. J. P. Rasor and C. Rüchardt, *Chem. Ber.*, **122**, 1375 (1989).
163. M. de Carvalho, M. T. Okamoto, P. J. S. Moran, and J. A. R. Rodrigues, *Tetrahedron*, **47**, 2073 (1991).
164. M. Bucciarelli, A. Froni, I. Moretti, and G. Torre, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 456 (1978).
165. C. L. Drian and A. E. Greene, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5473 (1982).
166. A. Belan, J. Bolte, A. Fauve, J. G. Gourcy, and H. Veschambre, *J. Org. Chem.*, **52**, 256 (1987).
167. T. Sugai and H. Ohta, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1577 (1990).
168. H. Suemune, N. Hayashi, K. Funakosi, H. Akita, T. Oishi, and K. Sakai, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2168 (1985).
169. T. Sugai, T. Yokochi, N. Watanabe, and H. Ohta, *Tetrahedron*, **47**, 7227 (1991).
170. S. Iriuchijima and N. Kojima, *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 451 (1978).

171. R. Bernardi, P. Bravo, R. Cardillo, D. Ghiringhelli, and G. Resnati, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 2831 (1988).
172. T. Fujisawa, T. Itoh, M. Nakai, and T. Sato, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 771 (1985).
173. M. Bucciarelli, A. Forni, I. Moretti, F. Prati, G. Torre, G. Resnati, and P. Bravo, *Tetrahedron*, **45**, 7505 (1989).
174. A. S. Gopalan and H. K. Jacobs, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 5575 (1990).
175. R. Tanikaga, K. Hosoya, and A. Kaji, *Synthesis*, 389 (1987).
176. T. Sato, Y. Okumura, J. Itai, and T. Fujisawa, *Chem. Lett.*, 1537 (1988).
177. D. Ghiringhelli, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 287 (1983).
178. R. Bernardi, R. Cardillo, D. Ghiringhelli, and O. Vajna de Pava, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1607 (1987).
179. T. Fujisawa, E. Kojima, T. Itoh, and T. Sato, *Chem. Lett.*, 1751 (1985).
180. G. Guanti, L. Banfi, and E. Narisano, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 3547 (1986).
181. G. Guanti, L. Banfi, A. Guaragna, and E. Narisano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 138 (1986).
182. S. Tsuboi, N. Kohara, K. Doi, M. Utaka, and A. Takeda, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 3205 (1988).
183. R. J. Linderman, A. Ghannam, and I. Badejo, *J. Org. Chem.*, **56**, 5213 (1991).
184. T. Fujisawa, H. Hayashi, and Y. Kishioka, *Chem. Lett.*, 129 (1987).
185. K. Nakamura, Y. Inoue, J. Shibahara, S. Oka, and A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4769 (1988).
186. T. Sato, T. Mizutani, Y. Okumura, and T. Fujisawa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3701 (1989).
187. R. Lis, W. B. Caldwell, G. I. Rudd, W. C. Lumma, Jr., G. A. Hoyer, K. Petzoldt, G. Cleve, and G. Sauer, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1487 (1987).
188. T. Itoh, Y. Takagi, and T. Fujisawa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3811 (1989).
189. T. Itoh, T. Fukuda, T. Fujisawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 3851 (1989).
190. A. Manzocchi, A. Fiecchi, and E. Santaniello, *Synthesis*, 1007 (1987).

191. J. Barry and H. B. Kagan, *Synthesis*, 453 (1981).
192. F. Aragozzini, E. Maconi, D. Potenza, and C. Scolastico, *Synthesis*, 225 (1989).
193. S. Ramaswamy and A. C. Oehlschlager, *Tetrahedron*, **47**, 1145 (1991).
194. J. Sakaki, M. Suzuki, S. Kobayashi, M. Sato, and C. Kaneko, *Chem. Lett.*, 901 (1990).
195. J. Sakai, Y. Sugita, M. Sato, and C. Kaneko, *Tetrahedron*, **47**, 6197 (1991).
196. A. P. Kozikowski, B. B. Mugrage, C. S. Li, and L. Felder, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4817 (1986).
197. K. Nakamura, T. Kitayama, Y. Inoue, and A. Ohno, *Tetrahedron*, **46**, 7471 (1990).
198. T. Fujisawa, K. Yamanaka, B. I. Mobeke, and M. Shimizu, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 399 (1991).
199. T. Takamura, Y. Hosoya, and N. Mori, *Can. J. Chem.*, **68**, 523 (1990).
200. M. Kasai and H. Ziffer, *J. Org. Chem.*, **48**, 712 (1983).
201. R. Bel-Rhlid, A. Fauve, and H. Veschambre, *J. Org. Chem.*, **54**, 3221 (1989).
202. T. Fujisawa, E. Kojima, and T. Sato, *Chem. Lett.*, 2227 (1987).
203. T. Fujisawa, E. Kojima, T. Itoh, and T. Sato, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 6089 (1985).
204. R. Chenevert and S. Thiboutot, *Chem. Lett.*, 1191 (1988).
205. H. Ohta, J. Konishi, Y. Kato, and G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 2421 (1987).
206. J. Konishi, H. Ohta, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 1111 (1985).
207. J. Bolte, J.-G. Gourcy, and H. Veschambre, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 565 (1986).
208. H. Ohta, K. Ozaki, and G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2499 (1986).
209. R. Chenevert and S. Thiboutot, *Can. J. Chem.*, **64**, 1599 (1986).
210. A. Fauve and H. Veschambre, *J. Org. Chem.*, **53**, 5215 (1988).
211. G. Dauphin, A. Fauve, and H. Veschambre, *J. Org. Chem.*, **54**, 2238 (1989).
212. A. Fauve, H. Veschambre, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 5037 (1987).
213. H. Ohta, K. Ozaki, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 2225 (1987).
214. A. Fauve and H. Veschambre, *Biocatalysis*, **3**, 95 (1990).

215. R. P. Short, R. M. Kennedy, and S. Masamune, *J. Org. Chem.*, **54**, 1755 (1989).
216. H. Gibian, K. Kieslich, H.-J. Koch, H. Kosmol, C. Rufer, E. Schrödre, and R. Vössing, *Tetrahedron Lett.*, 2321 (1966).
217. H. Kosmol, K. Keislich, R. Vössing, H.-J. Koch, K. Petzoldt, and H. Gibian, *Liebigs Ann. Chem.*, **701**, 198 (1967).
218. L. M. Kogan, V. E. Gulaya, and I. V. Torgov, *Tetrahedron Lett.*, 4673 (1967).
219. D. W. Brooks, P. G. Grothaus, and W. L. Irwin, *J. Org. Chem.*, **47**, 2820 (1982).
220. D. W. Brooks, H. Mazdiyasni, and S. Chakrabarti, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 1241 (1984).
221. D. W. Brooks, H. Mazdiyasni, and P. G. Grothaus, *J. Org. Chem.*, **52**, 3223 (1987).
222. W.-M. Dai and W.-S. Zhou, *Tetrahedron*, **41**, 4475 (1985).
223. M. Yanai, T. Sugai, and K. Mori, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2373 (1985).
224. K. Mori and H. Mori, *Tetrahedron*, **41**, 5487 (1985).
225. A. Murai, N. Tanimoto, N. Sakamoto, and T. Masamune, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1985 (1988).
226. Y. Lu, G. Barth, K. Kieslich, P. D. Strong, W. L. Duax, and C. Djerassi, *J. Org. Chem.*, **48**, 4549 (1983).
227. K. Mori and M. Fujiwhara, *Tetrahedron*, **44**, 343 (1988).
228. T. Kitahara, M. Miyake, M. Kido, and K. Mori, *Tetrahedron :Asymmetry*, **1**, 775 (1990).
229. D. W. Brooks, H. Mazdiyasni, and P. Sallay, *J. Org. Chem.*, **50**, 3411 (1985).
230. H. G. W. Leuenberger, W. Boguth, E. Widmer, and R. Zell, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1832 (1976).
231. A. Kergomard, M. F. Renard, and H. Veschambre, *Tetrahedron Lett.*, 5197 (1978).
232. M. Utaka, S. Konishi, and A. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4737 (1986).
233. A. Arnone, R. Cardillo, G. Nasini, and O. V. de Pava, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 3061 (1990).
234. M. Utaka, S. Onoue, and A. Takeda, *Chem. Lett.*, 971 (1987).

235. H. Ohta, K. Ozaki, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 191 (1987).
236. H. Ohta, N. Kobayashi, and K. Ozaki, *J. Org. Chem.*, **54**, 1802 (1989).
237. M. Utaka, S. Konishi, T. Okubo, S. Tsuboi, and A. Takeda, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 1447 (1987).
238. E. Santaniello, P. Ferraboschi, P. Grisenti, F. Aragozzini, and E. Maconi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 601 (1991).
239. M. Utaka, S. Konishi, A. Mizuoka, T. Ohkubo, T. Sakai, S. Tsuboi, and A. Takeda, *J. Org. Chem.*, **54**, 4989 (1989).
240. C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, and H.-E. Högberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 3061 (1988).
241. M. Desrut, A. Kergomard, M. F. Renard, and H. Veschambre, *Tetrahedron*, **37**, 3825 (1981).
242. P. Gramatica, G. Giardina, G. Speranza, and P. Manitto, *Chem. Lett.*, 1395 (1985).
243. P. Gramatica, P. Manitto, and L. Poli, *J. Org. Chem.*, **50**, 4625 (1985).
244. P. Gramatica, P. Manitto, D. Monti, and G. Speranza, *Tetrahedron*, **44**, 1299 (1988).
245. C. Neuberg and J. Hirsch, *Biochem. Z.*, **115**, 282 (1921).
246. C. Fuganti, D. Ghiringhelli, and P. Grasselli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 846 (1975).
247. C. Fuganti, P. Grasselli, and G. Marinoni, *Tetrahedron Lett.*, 1161 (1979).
248. R. Bernardi, C. Fuganti, P. Grasselli, and G. Marinoni, *Synthesis*, 50 (1980).
249. G. Bertolli, G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, L. Majori, and F. Spreafico, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 965 (1981).
250. C. Fuganti and P. Grasselli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 205 (1982).
251. G. Fronza, C. Fuganti, P. Grasselli, L. Majori, G. Pedrocchi-Fantoni, and F. Spreafico, *J. Org. Chem.*, **47**, 3289 (1982).
252. C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, F. Spreafico, C. Zirotti, and P. Casati, *J. Org. Chem.*, **49**, 4087 (1984).
253. C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, and A. Zorzella, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*,

1619 (1988).

- 254. C. Fuganti and P. Grasselli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 299 (1978).
- 255. G. Fronza, C. Fuganti, and P. Grasselli, *Tetrahedron Lett.*, 3941 (1978).
- 256. G. Fronza, C. Fuganti, and P. Grasselli, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 442 (1980).
- 257. C. Fuganti, P. Grasselli, S. Servi, and C. Zirotti, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 4269 (1982).
- 258. C. Fuganti, S. Servi, and C. Zirotti, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 5285 (1983).
- 259. C. Fuganti, P. Grasselli, G. Pedrocchi-Fantoni, S. Servi, and C. Zirotti, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 3753 (1983).
- 260. C. Fuganti, P. Grasselli, and S. Servi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 241 (1983).
- 261. C. Fuganti, P. Grasselli, F. Spreafico, C. Zirotti, and P. Casati, *J. Org. Chem.*, **49**, 543 (1984).
- 262. S. Servi, *J. Org. Chem.*, **50**, 5865 (1985).
- 263. D. H. Crout, H. Dalton, D. W. Hutchinson, and M. Miyagoshi, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1329 (1991).
- 264. S. Shimizu, H. Hata, and H. Yamada, *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2285 (1984).
- 265. K. Nakamura, Y. Kawai, T. Miyai, S. Honda, N. Nakajima, and A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **64**, 1467 (1991).
- 266. R. P. Lanzilotta, D. G. Bradley, and C. C. Beard, *Appl. Microbiol.*, 427 (1975).
- 267. J. B. Jones and I. J. Jakovac, *Can. J. Chem.*, **60**, 19 (1982).
- 268. J. Davies and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 5405 (1979).
- 269. D. R. Dodds and B. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1080 (1982).
- 270. J. A. Haslegrave and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4666 (1982).
- 271. T. Takemura and J. B. Jones, *J. Org. Chem.*, **48**, 791 (1983).
- 272. L. K. P. Lam, I. A. Gair, and J. B. Jones, *J. Org. Chem.*, **53**, 1611 (1988).
- 273. M. A. Luyten, D. Bur, H. Wynn, W. Parris, M. Gold, J. D. Friesen, and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6800 (1989).
- 274. A. R. Krawczyk and J. B. Jones, *J. Org. Chem.*, **54**, 1795 (1989).

275. B. L. Hirschbein and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4458 (1982)..
276. M.-J. Kim and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 2959 (1988).
277. M.-J. Kim and J. Y. Kim, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 326 (1991).
278. E. Keinan, E. K. Hafeli, K. K. Seth, and R. Lamed, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 162 (1986).
279. E. Keinan, K. K. Seth, and R. Lamed, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3474 (1986).
280. D. G. Drueckhammer, C. F. Baras III, K. Nozaki, and C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **53**, 1607 (1988).
281. M. De Amici, C. D. Micheli, G. Carrea, and S. Spezia, *J. Org. Chem.*, **54**, 2646 (1989).
282. G.-J. Shen, Y.-F. Wang, C. Bradshaw, and C.-H. Wong, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 677 (1990).
283. L. G. Lee and G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.*, **51**, 25 (1986).
284. K. Nakamura, T. Yoneda, T. Miyai, K. Ushio, S. Oka, and A. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 2453 (1988).
285. A. J. Irwin and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 1625 (1977).
286. I. J. Jakovac, H. B. Goodbrand, K. P. Lok, and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 4659 (1982).
287. J. B. Jones and C. J. Francis, *Can. J. Chem.*, **62**, 2578 (1984).
288. J. B. Jones and T. Takemura, *Can. J. Chem.*, **62**, 77 (1984).
289. A. J. Bridges, P. S. Raman, G. S. Y. Ng, and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 1461 (1984).
290. G. S. Y. Ng, L.-C. Yuan, I. J. Jakovac, and J. B. Jones, *Tetrahedron*, **43**, 1235 (1984).
291. K. P. Lok, I. J. Jakovac, and J. B. Jones, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2521 (1985).
292. J. Hasegawa, M. Ogura, S. Hamaguchi, M. Shimazaki, H. Kawaharada, and K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.*, **59**, 203 (1981).
293. J. Hasegawa, S. Hamaguchi, M. Ogura, and K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.*, **59**,

257 (1981).

294. J. Hasegawa, M. Ogura, H. Kanema, N. Noda, H. Kawaharada, and K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 501 (1982).
295. J. Hasegawa, M. Ogura, H. Kanema, H. Kawaharada, and K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.*, **60**, 591 (1982).
296. J. Hasegawa, M. Ogura, H. Kanema, H. Kawaharada, and K. Watanabe, *J. Ferment. Technol.*, **61**, 37 (1983).
297. H. Ohta, Y. Okamoto, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 205 (1984).
298. H. Ohta, Y. Okamoto, and G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 671 (1985).
299. H. Ohta, Y. Okamoto, and G. Tsuchihashi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2229 (1985).
300. H. Ohta, Y. Kato, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 581 (1986).
301. Y. Okamoto, H. Ohta, and G. Tsuchihashi, *Chem. Lett.*, 2049 (1986).
302. H. Ohta, Y. Kato, and G. Tsuchihashi, *J. Org. Chem.*, **52**, 2735 (1987).
303. H. Ohta, S. Matsumoto, Y. Okamoto, and T. Sugai, *Chem. Lett.*, 625 (1989).
304. H. L. Holland, *Chem. Rev.*, **88**, 473 (1988).
305. D. T. Gibson, M. Hensley, H. Yoshioka, and T. J. Mabry, *Biochemistry*, **9**, 1626 (1970).
306. D. M. Jerina, J. W. Daly, A. M. Jeffrey, and D. T. Gibson, *Arch. Biochem. Biophys.*, **142**, 394 (1971).
307. D. T. Gibson, J. R. Koch, C. L. Schuld, and R. E. Kallio, *Biochemistry*, **7**, 3795 (1968).
308. A. M. Jeffrey, H. J. C. Yeh, D. M. Jerina, T. R. Patel, J. F. Davey, and D. T. Gibson, *Biochemistry*, **14**, 575 (1975).
309. D. T. Gibson, R. L. Roberts, M. C. Wells, and V. M. Kobal, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 211, (1973).
310. D. T. Gibson, V. Mahadevan, and J. F. Davey, *J. Bacteriol.*, **119**, 930 (1974).
311. G. M. Whited, W. R. McCombie, L. D. Kwart, and D. T. Gibson, *J. Bacteriol.*, **166**, 1028 (1986).

312. H. Ziffer, K. Kabuto, D. T. Gibson, M. Kobal, and D. M. Jerina, *Tetrahedron*, **33**, 2491 (1977).
313. D. G. H. Ballard, A. Courtis, I. M. Shirley, and S. C. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 954 (1983).
314. P. W. Howard, G. R. Stephenson, and S. C. Taylor, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1182 (1990).
315. K. Furuhashi, A. Taoka, S. Uchida, I. Karube, and S. Suzuki, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 39 (1981).
316. K. Furuhashi, M. Shintani, and M. Takagi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 218 (1986).
317. O. Takahashi, J. Umezawa, K. Furuhashi, and M. Takagi, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1583 (1989).
318. H. Ohta and H. Tetsukawa, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 894 (1978).
319. H. Ohta and H. Tetsukawa, *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 2099 (1979).
320. J. D. Fourneron, A. Archelas, and R. Furstoss, *J. Org. Chem.*, **54**, 4686 (1989).
321. X. M. Zhang, A. Archelas, and R. Furstoss, *J. Org. Chem.*, **56**, 3814 (1991).
322. B. Cambou, and A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 2687 (1984).
323. P. Cesti, A. Zaks, and A. M. Klivanov, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **11**, 401 (1985).
324. G. Kirchner, M. P. Scollar, and A. M. Klivanov, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 7072 (1985).
325. A. Zaks and A. M. Klivanov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 3192 (1985).
326. A. M. Klivanov, *CHEMTECH*, 354 (1986).
327. A. M. Klivanov, *Acc. Chem. Res.*, **23**, 114 (1990).
328. M. Dégueil-Castaing, B. D. Jeso, S. Drouillard, and B. Maillard, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 953 (1987).
329. J. Hiratake, M. Inagaki, T. Nishioka, and J. Oda, *J. Org. Chem.*, **53**, 6130 (1988).
330. Y. Wang and C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **53**, 3127 (1988).
331. Y. Wang, J. J. Lalonde, M. Momongan, D. E. Bergbreiter, and C.-H. Wong, *J. Am.*

- Chem. Soc.*, **110**, 7200 (1988).
332. K. Laumen, D. Breitgoff, and M. P. Schneider, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1459 (1988).
333. A. Ghogare and G. S. Kumar, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1533 (1989).
334. T. Miyazawa, T. Takitani, S. Ueji, T. Yamada, and S. Kuwata, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1214 (1988).
335. T. Miyazawa, H. Iwanaga, S. Ueji, T. Yamada, and S. Kuwata, *Chem. Lett.*, 2219 (1989).
336. G. Langrand, J. Baratti, G. Buono, and C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 29 (1986).
337. D. Bianchi, W. Cabri, P. Cesti, F. Francalanchi, and M. Ricci, *J. Org. Chem.*, **53**, 104 (1988).
338. P. Mohr, L. Rösslein, and C. Tamm, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2513 (1989).
339. A. L. Gutman, K. Zuobi, and T. Bravdo, *J. Org. Chem.*, **55**, 3546 (1990).
340. C. J. Francis and J. B. Jones, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 579 (1984).
341. E. Santaniello, M. Chiari, P. Ferraboschi, and S. Trave, *J. Org. Chem.*, **53**, 1567 (1988).
342. F.-C. Huang, L. F. Heu Lee, R. S. D. Mittal, P. R. Ravikumar, J. A. Chan, and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 4144 (1975).
343. M. Ohno, S. Kobayashi, T. Iimori, Y.-F. Wang, and T. Izawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 2405 (1981).
344. F. Björkling, J. Boutelje, S. Gatenbeck, K. Hult, and T. Norin, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 4957 (1985).
345. C.-S. Chen, Y. Fujimoto, and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3580 (1981).
346. Y. Wang, J. J. Lalonds, M. Momongar, D. E. Berbreiter, and C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 7200 (1988).
347. K. Burgess and L. D. Jennings, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 6129 (1991).
348. K. Nakamura, Y. Inoue, T. Kitayama, and A. Ohno, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1569

- (1990).
349. K. Burgess and L. D. Jennings, *J. Org. Chem.*, **55**, 1138 (1990)
350. M. Inagaki, J. Hiratake, T. Nishioka, and J. Oda, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1879 (1989).
351. K. Laumen, R. Seemayer, and M. P. Schneider, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 49 (1990).
352. R. Seemayer and M. P. Schneider, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 49 (1991).
353. G. Langrand, M. Secchi, G. Buono, J. Baratti, and C. Triantaphylides, *Tetrahedron Lett.*, **26**, 1857 (1985).
354. G. M. Tombo, H.-P. Schaer, X. Fernandez, I. Busquits, and O. Gisalba, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 5707 (1986).
355. K. Tsuji, Y. Terao, and K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 6189 (1989).
356. Y. Terao, M. Murata, and K. Achiwa, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5137 (1988).
357. U. Ader, D. Britgoff, P. Klein, K. E. Laumen, and M. P. Schneider, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 1793 (1989).
358. H. Hemmerle and H. Gais, *Tetrahedron Lett.*, **28**, 3471 (1987).
359. G. Guanti, L. Banfi, E. Narisano, R. Riva, and S. Thea, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4636 (1986).
360. K. Laumen and M. P. Schneider, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1298 (1986).
361. K. Laumen and M. P. Schneider, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5875 (1984).
362. H. Ohta, K. Matsumoto, S. Tsutsumi, and T. Ihori, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 485 (1989).
363. K. Matsumoto and H. Ohta, *Chem. Lett.*, 1589 (1989).
364. K. Matsumoto and H. Ohta, *Chem. Lett.*, 1109 (1989).
365. K. Matsumoto, S. Tsutsumi, T. Ihori, and H. Ohta, *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 9614 (1990).
366. W. J. Hennen, H. M. Sweers, Y.-F. Wang, and C.-H. Wong, *J. Org. Chem.*, **53**, 4939 (1988).

367. A. Uemura, K. Nozaki, J. Yamashita, and M. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3817 (1989).
368. A. Uemura, K. Nozaki, J. Yamashita, and M. Yasumoto, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 3819 (1989).
369. N. Baba, M. Mimura, J. Hiratake, K. Uchida, and J. Oda, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2685 (1988).
370. N. W. Boez, *Tetrahedron Lett.*, **30**, 2061 (1989).
371. K. Nakamura, K. Ishihara, A. Ohno, M. Uemura, H. Nishimura, and Y. Hayashi, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3605 (1990).
372. Y. Yamazaki and K. Hosono, *Tetrahedron Lett.*, **31**, 3895 (1990).
373. R. Noyori, T. Ohkuma, M. Kitamura, H. Takaya, N. Sayo, H. Kumobayashi, and S. Akutagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 5856 (1987).
374. M. Kitamura, T. Ohkuma, H. Takaya, and R. Noyori, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 1555 (1988).
375. W. Shieh, A. S. Gopalan, and C. J. Sih, *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 2993 (1985).
376. R. J. Lamed and J. G. Zeikus, *Biochem. J.*, **195**, 183 (1981).
377. N. Itoh, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 3029 (1982).
378. H. Schütte, W. Hummel, and M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 167 (1984).
379. A. Furuichi, H. Akita, H. Matsukura, T. Oishi, and K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2563 (1985).
380. A. Furuichi, H. Akita, H. Matsukura, T. Oishi, and K. Horikoshi, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 293 (1987).
381. R. Rella, C. A. Raia, M. Pensa, F. M. Pisani, A. Gambacorta, M. De Rosa, and M. Rossi, *Eur. J. Biochem.*, **167**, 475 (1987).
382. W. Hummel, H. Schütte, and M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 433 (1988).
383. T. Oishi and T. Nakata, *Acc. Chem. Res.*, **17**, 338 (1984).

384. S. Masamune and W. Choy, *Aldrichimica*, **15**, 47 (1982).
385. T. Itoh, K. Kuroda, M. Tomosada, and Y. Takagi, *J. Org. Chem.*, **56**, 797 (1991).
386. R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widhalm, K. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Taketomi, and H. Kumobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 9134 (1989).
387. Y. Yamazaki and H. Maeda, *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 2621 (1986).
389. W. Hummel, H. Schütte, and M.-R. Kula, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 75 (1983).
390. W. Hummel, H. Schütte, and M.-R. Kula, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 7 (1985).
391. K. Nakamura, T. Miyai, A. Nagar, B. R. Babu, T. Ando, and A. Ohno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **63**, 298 (1990).
392. J. Heidlas, K.-H. Engel, and R. Tressl, *Eur. J. Biochem.*, **172**, 633 (1988).
393. A. Fersht, "Enzyme Structure and Mechanism," W. H. Freeman and Co., New York (1985), pp. 98-107.
394. L. Michaelis and M. L. Menten, *Biochem. Z.*, **49**, 333 (1913).
395. G. E. Griggs and J. B. S. Haldane, *Biochem. J.*, **19**, 338 (1925).
396. I. H. Segel, "Enzyme Kinetics," Wiley, New York (1975), pp. 125-135.
397. B. J. Davis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404 (1964).
398. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
399. J. J. Sedmak and S. E. Grossberg, *Anal. Biochem.*, **79**, 544 (1977).
400. G. S. Eadie, *J. Biol. Chem.*, **146**, 85 (1942).
401. B. H. J. Hofstee, *Nature*, **184**, 1296 (1959).